

## Genotipificación y fenotipificación de *Gallibacterium* sp procedentes de aves de corral con signos clínicos respiratorios

### Genotyping and phenotyping of *Gallibacterium* sp from poultry with respiratory clinical signs

Rony Yuniór Cotaquispe Nalvarte<sup>1,3</sup>, Ysabel Koga Yanagui<sup>2</sup>, Robert Tinoco Romero<sup>2</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la fenotipificación 60 aislados de *Gallibacterium* sp mediante un perfil de seis familias de antibióticos y su genotipificación por técnicas de ERIC-PCR, REP-PCR y BOXAIR. Se encontró que el 98.3% de los aislados resisten al menos a una familia de antimicrobianos, y el 11.7% fueron resistentes a las seis familias. La REP-PCR presentó 45 genotipos codificados de R1 hasta R45, la ERIC-PCR presentó 44 genotipos codificados de E1 hasta E44 y la BOXAIR presentó 56 genotipos codificados de B1 hasta B56, dispersos en los departamentos de Lima, Ica y Libertad (Perú). El estudio permitió tipificar *Gallibacterium* sp y el uso combinado de métodos genotípicos y fenotípicos permitió una discriminación más precisa entre aislamientos potencialmente diferentes con moderada diversidad genética en las ciudades de Lima, Libertad y Ica.

**Palabras clave:** *Gallibacterium* sp, fenotipificación, genotipificación, ERIC-PCR, REP-PCR, BOXAIR

#### ABSTRACT

The aim of this study was the phenotyping of 60 isolates of *Gallibacterium* sp through a profile of six families of antibiotics and their genotyping by ERIC-PCR, REP-PCR and BOXAIR techniques. It was found that 98.3% of the isolates are resistant to at least one family of antimicrobials, and 11.7% were resistant to all six families. The REP-PCR presented 45 genotypes encoded from R1 to R45, the ERIC-PCR presented 44

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Bioservice SRL, Lima, Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología, Bioservice SRL, Lima, Perú

<sup>3</sup> E-mail: r.cotaquispe.n@gmail.com

Recibido: 30 de abril de 2019

Aceptado para publicación: 7 de enero de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

genotypes encoded from E1 to E44 and BOXAIR presented 56 genotypes encoded from B1 to B56, dispersed in the departments of Lima, Ica and Libertad (Peru). The study allowed to typify *Gallibacterium* sp and the combined use of genotypic and phenotypic methods allowed a more precise discrimination between potentially different isolates with moderate genetic diversity in the cities of Lima, Libertad and Ica.

**Key words:** *Gallibacterium* sp, phenotyping, genotyping, ERIC-PCR, REP-PCR, BOXAIR

## INTRODUCCIÓN

*Gallibacterium* sp es un microorganismo patógeno primario en aves, de características Gram negativos, inmóviles, encapsulados, no esporulados, pleomórficos, mesófilos y anaerobios facultativos o microaerófilos. Pertenece al orden Pasteurellales, familia Pasteurellaceae y el género presenta tres especies: *G. anatis* y *G. genomospecies* 1 y 2. Se pueden identificar microbiológicamente por medio de cultivo, así como molecularmente mediante PCR (Bojesen *et al.*, 2007).

Esta bacteria es altamente variable, ya que actualmente se describen 24 biovares por pruebas bioquímicas utilizando diferentes azúcares (Osuna *et al.*, 2017). Las bacterias altamente variables sufren frecuentemente nuevos cambios genéticos, ya sea por mutaciones debido a su adaptación al medio en que se desarrollan o como consecuencia del intercambio de material genético entre los mismos (Mendoza *et al.*, 2014). Además, el abuso de antibióticos acelera las mutaciones genéticas, adaptándose a los nuevos fármacos (Mendoza *et al.*, 2014).

Existen diversos métodos para identificar la variabilidad en *Gallibacterium* sp. Entre estos se tienen los ensayos bioquímicos, la susceptibilidad antimicrobiana, y las pruebas moleculares (Singh *et al.*, 2015). Entre los métodos moleculares para tipificar bacterias, se ha encontrado que las huellas genómicas de REP-PCR, ERIC-PCR y

BOX-PCR (denominadas colectivamente como rep-PCR) son extremadamente confiables, reproducibles, rápidas y altamente discriminatorias. Este método se basa en la amplificación de las secuencias de ADN mediante PCR con conjuntos de cebadores complementarios a las secuencias de ADN repetitivas naturales, altamente conservadas, presentes en múltiples copias en distintas posiciones intergénicas en los genomas de la mayoría de las bacterias Gram negativas y varias Gram positivas (Oliveira *et al.*, 2007)

El objetivo del presente trabajo fue tipificar las cepas de *Gallibacterium* sp aisladas de aves comerciales con infecciones respiratorias, así como la elaboración de programas efectivos de sanidad aviar en los cuales se consideren cepas endémicas de los principales departamentos de producción avícola de Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

Se trabajó con 60 cepas de *Gallibacterium* sp aisladas de muestras de pollos (BB y de carne), gallinas de postura y gallinas reproductoras con enfermedades respiratorias provenientes de granjas de los departamentos de La Libertad, Ica y Lima (Perú) entre 2014 y 2018. Las cepas se encontraban liofilizadas y guardadas en glicerol a -20 °C y se tenía registrada la historia clínica del caso y el análisis anatomopatológico (Mendoza *et al.*, 2014).

## **Análisis Microbiológico**

Las aves fueron sacrificadas, se incidió en las barbillas y senos infraorbitarios, se hisoparon las secreciones nasales y tráquea. Asimismo, se ingresó en las cavidades torácica y abdominal en donde se hisoparon pulmones y sacos aéreos, y se hicieron improntas de hígado y ovario. Luego los hisopados e improntas fueron sembrados en placas de agar sangre de ovino al 5 % (las cuales fueron introducidas en campanas de microaerobiosis) y agar MacConkey. Finalmente se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas (Mendoza *et al.*, 2014).

## **Sensibilidad Antimicrobiana**

Se realizó un perfil de resistencia antimicrobiana para seis familias de antibióticos de importancia veterinaria, mediante el método de difusión en agar sangre al 5% con nueve discos de sensibilidad: Oxitetraciclina 20 µg, Florfenicol 30 µg, Fosfomicina 50 µg, Amoxicilina 20 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Enrofloxacin 5 µg, Doxiciclina 30 µg, Norfloxacina 10 µg, Sulfatrimetropin 1.25/23.75 µg. La placa preparada con el inóculo y los discos de antibióticos se incubó a 37 °C durante 24 a 48 horas. Los resultados se leyeron midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento, interpretándose como sensible, intermedio o resistente, según los lineamientos del Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS, 2002).

## **Identificación y Tipificación Molecular**

### *Extracción de ADN*

El ADN de las 60 cepas de *Gallibacterium* sp fue extraído mediante el método de membranas de sílica gel utilizando el GF-1 Tissue DNA Extraction kit (Vivantis, Malasia), siguiendo las indicaciones del protocolo de extracción del fabricante.

### *Detección molecular por PCR*

*Gallibacterium* sp fue detectado mediante amplificación por PCR, a partir de la secuencia de los genes ribosómicos 16S y 23S. Se utilizaron los cebadores forward: 1133fgal - 5' - TAT TCT TTG TTA CCA CCG G - 3' y el reverse: 114r - 5' - GGT TTC CCC ATT CGG - 3'. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo 10 µl del buffer 2X HOT STAR PCR, 1 µl de ambos cebadores a 10 pmol/µl y 3 µl de ADN genómico a 5 ng/µl. Los ciclos termales fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial: 95 °C por 4 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s; alineamiento a 55 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 45 s; 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min, realizados en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Life Technologies) (Bojesen *et al.*, 2007b; Ataei *et al.*, 2017).

Los productos de PCR para su análisis se corrieron en una cámara electroforética, cargando 3 µl de producto de PCR mezclado con 2 µl de Fluorescent DNA Loading dye en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Tris 0.89 M, Borato 0.02 M, EDTA 0.89 M, pH 8.3) por 40 min a 100 v y luego visualizados bajo UV en fotodocumentador Major Science.

### *Tipificación molecular por ERIC-PCR*

Genotipificación por Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR (ERIC-PCR) se realizó utilizando los cebadores: ERIC1R: 5'-ATGTAAGCTCC-TGGGGATTAC-3' y ERIC2: 5'-AAGTA-AGTGACTGGGGTGAGCG-3') que amplifican regiones repetitivas VNTRS. El volumen final de la amplificación fue 20 µl, utilizando las concentraciones de 10 X Buffer PCR, 25 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de cada cebador, 1 U Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 4 µl de 5 ng/µl de ADN genómico. Los ciclos termales utilizados fueron: 1 ciclo desnaturalización inicial

de 95 °C por 4 min; 35 ciclos: desnaturalización a 94 °C por 30 s; alineamiento a 40 °C por 3 min y extensión a 72 °C por 2 min, y finalmente un ciclo de extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos de PCR de ERIC-PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X durante 50 min a 100 v y visualizados bajo luz UV (Oliveira *et al.*, 2007; Mendoza *et al.*, 2014).

#### *Análisis de patrones VNTRS para ERIC-PCR*

Los patrones de ERIC-PCR en el gel de agarosa fueron transformados a una matriz bidimensional de ausencia (0) o presencia (1) generados por el programa GelAnalyzer v. 2010. El análisis de la variabilidad genética intra e interespecífica para las 60 cepas de *Gallibacterium* sp fue realizada utilizando similarity index de Jaccard con un bootstraps de 1000 réplicas y dendogramas generados en base a una matriz de distancia genética mediante el método clásico paired group UPGMA aplicando el programa PAST 3.23 (Hammer *et al.*, 2001).

#### *Tipificación molecular por REP-PCR y BOXAIR*

El Repetitive Extragenic Palindromic PCR (REP-PCR) se realizó con los cebadores REP 1 (5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3') y REP 2 (5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3'). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo 2.5 µl a 25 pmol de cada cebador, buffer de PCR 1X (tris 10 mM, KCl 50 mM; pH 8.3), dNTPs 0.2 mM, MgCl<sup>2</sup> 2.5 mM, 1U de ADN polimerasa Taq (Fermentas) y 4 µl de ADN de plantilla a 5 ng/µl. La amplificación se desarrolló en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) con las condiciones termales siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos: desnaturalización a 90 °C durante 30 s, pri-

mer alineamiento a 50 °C durante 30 s, segundo alineamiento a 52 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min; y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 8 min. Condiciones similares a lo descrito por Oliveira *et al.* (2007) y Albufera *et al.* (2009).

El BOXAIR-PCR fingerprinting para enterobacterias se realizó con el cebador 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3 y las concentraciones en un volumen final de 20 µl fueron: 2 µl del cebador BOXAIR a 20 pmol, buffer de PCR 1X (tris 10 mM, KCl 50 mM; pH 8.3), dNTPs 0.2 mM, MgCl<sup>2</sup> 2.5 mM, 1U de ADN polimerasa Taq (Fermentas) y 4 µl de ADN de plantilla a 5 ng/µl. Los ciclos termales para BOXAIR fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min, 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 50 °C durante 60 s, extensión a 65 °C durante 1 min y un ciclo de extensión final a 65 °C durante 8 min. La amplificación se realizó en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Life Technologies).

Los productos de PCR de REP Y BOXAIR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X durante 50 min a 100 v y visualizados bajo luz UV (Oliveira *et al.*, 2007; Albufera *et al.*, 2009).

#### *Análisis de patrones VNTRS para REP-PCR y BOX AIR*

El análisis de las huellas dactilares genéticas (ADN fingerprinting) de REP-PCR y BOX AIR fue realizado a partir de los patrones de bandeos transformados en matriz bidimensional de ausencia (0) o presencia (1) generados por el programa GelAnalyzer v. 2010, aplicando una matriz de (dis)similaridad utilizando el coeficiente de JACCARD y el desarrollo del dendograma utilizando el método clásico de distancia genética paired group UPGMA mediante el programa PAST 3.23 (Hammer *et al.*, 2001).

### *Poder discriminatorio de los métodos de tipificación*

El poder discriminatorio se midió mediante el índice de diversidad (1-D) de Simpson cuyo valor oscila entre 0 y 1, que indica la probabilidad promedio de que un sistema de tipificación asigne un tipo diferente a dos cepas no relacionadas muestreadas al azar de una población o representa la probabilidad de que dos individuos de la misma especie seleccionados aleatoriamente de una muestra presenten diversidad genética. Para la interpretación del índice, cuanto mayor es el valor, mayor es la diversidad genética de la muestra (Oliveira *et al.*, 2007).

## RESULTADOS

El 100% de los aislados (n=60) fueron similares a las características microbiológicas en agar sangre de ovino al 5% y al perfil bioquímico compatible a *Gallibacterium* sp. Además, todas las cepas se confirmaron mediante reacción de la cadena polimerasa (PCR), amplificando los genes ribosómicos 16S y 23S para *Gallibacterium* sp (790 bp) y para *Gallibacterium anatis* (1080 bp) o *Gallibacterium genomospecies* 1 y 2 (1030 bp) (Figura 1).

Los aislados mostraron una elevada multiresistencia a antibióticos. El 98.3% de los aislados fueron resistentes al menos a una o más familias de antibióticos y el 11.7% de los aislados fueron multidrogo resistentes (resistencia a las seis familias de antibióticos). Los aislados mostraron mayores perfiles de resistencia a las tetraciclinas: Oxitetraciclina 93.3% (56/60), Sulfonamidas potenciadas: Sulfatrimetropin 78.3% (47/60) y Quinolonas: Enrofloxacina 73.3% (44/60), mientras que la mayor sensibilidad fue para los Fosfonatos: Fosfomicina 43.3% (26/60) (Cuadro 1).

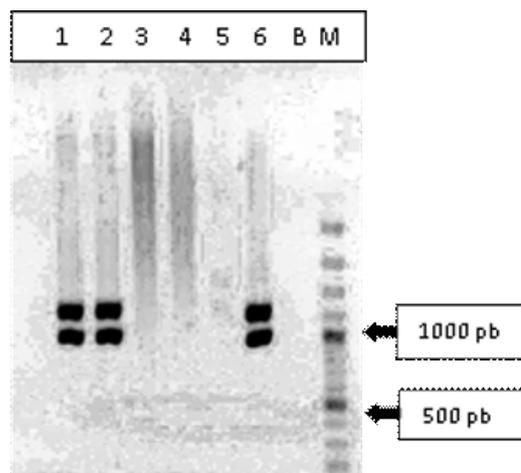


Figura 1. Detección de *Gallibacterium* spp por PCR del gen 16S rRNA. Carril 1-2: ADN obtenido de cepa de *Gallibacterium* spp; Carril 3-4: muestras negativas; Carril 5. Control negativo, ADN de *Pasteurella multocida* ATCC® 12945; Carril 6. Control positivo, ADN de *G. anatis* ATCC® 542; B: Blanco de PCR; M, Marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

### Fingerprinting ERIC-PCR

De las 60 cepas de *Gallibacterium* sp se obtuvieron 44 perfiles genéticos codificados de E1 a E44 (Cuadros 2 y 3). Los tamaños de productos amplificados presentaban rangos entre 300 y 3000 bp, formando un grupo general de 17 bandas: 300, 350, 400, 500, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1500, 2000, 2250, 2500 y 3000 bp. El número de bandas por perfil variaba de 6 a 12, distribuidos en la totalidad de muestras, sin presentar patrones de bandeos conservados, lo que podría sugerir presencia de una gran diversidad clonal de *Gallibacterium* sp. El índice de diversidad Simpson (1-D) en este método de tipificación varió entre 0.76 y 0.97 aplicando el programa estadístico PAST 3.23, indicando que existe diversidad clonal (Figura 2).

Cuadro 1. Perfiles de resistencia a nueve antibióticos en cepas aisladas de *Gallibacterium anatis* en aves comerciales del Perú con infecciones respiratorias

Antimicrobiano		Resistentes		Intermedios		Sensibles	
		%	n	%	n	%	n
Fosfonatos	Fosfomicina	41.67	25	15	9	43.33	26
Penicilinas	Amoxicilina	70.00	42	1.67	1	28.33	17
Quinolonas	Ciprofloxacina	68.33	41	15	9	16.67	10
	Enrofloxacina	73.34	44	13.33	8	13.33	8
	Norfloxacina	66.66	40	16.67	10	16.67	10
Tetraciclinas	Doxiciclina	78.33	47	13.33	8	8.34	5
	Oxitetraciclina	93.33	56	1.67	1	5.00	3
Cloranfenicoles	Florfenicol	26.67	16	10.00	6	63.33	38
Sulfonamidas potenciadas	Sulfatrimetroprin	78.33	47	6.67	4	15.00	9

### Repetitive Extragenic Palindromic (REP-PCR)

El ensayo de amplificación de los cebadores REP-1R y REP-2 mostró 45 patrones genéticos (clones) codificados como R1-R45 (Cuadros 2 y 3). Los tamaños de productos amplificados presentaban los rangos de 300 aa 3000 bp, formando un grupo general de 13 bandas: 300, 350, 400, 500, 700, 800, 900, 1000, 1250, 1600, 2000, 2600 y 3000 bp (patrones). El número de bandas por perfil variaba de 2 a 7, distribuidos en la totalidad de muestras, sin presentar patrones de bandeos conservados, lo que podría sugerir presencia de una gran diversidad clonal de *Gallibacterium* sp. El índice de diversidad Simpson (1-D) en este método de tipificación oscila entre 0.61 y 0.97 aplicando el programa estadístico PAST 3.23, indicando que existe diversidad clonal (Figura 3).

### BOXAIR-PCR Fingerprinting Enterobacterias

En el ensayo de amplificación del cebador BOXAIR se obtuvieron 56 patrones genéticos (clones) codificados como B1-B56 (Cuadros 2 y 3). Los tamaños de productos amplificados presentaban los rangos de 200 a 3000 bp formando un grupo general de 12 bandas: 200, 300, 400, 600, 700, 800, 1000, 1250, 1400, 1700, 2200 y 3000 bp (patrones). El número de bandas por perfil variaba de 3 a 11 distribuidos en la totalidad de muestras, sin presentar patrones de bandeos conservados, lo que podría sugerir presencia de una gran diversidad clonal de *Gallibacterium* sp. El índice de diversidad Simpson (1-D) en este método de tipificación varió entre 0.5 y 0.97 aplicando el programa estadístico PAST 3.23, indicando que existe moderada diversidad clonal (Figura 4).

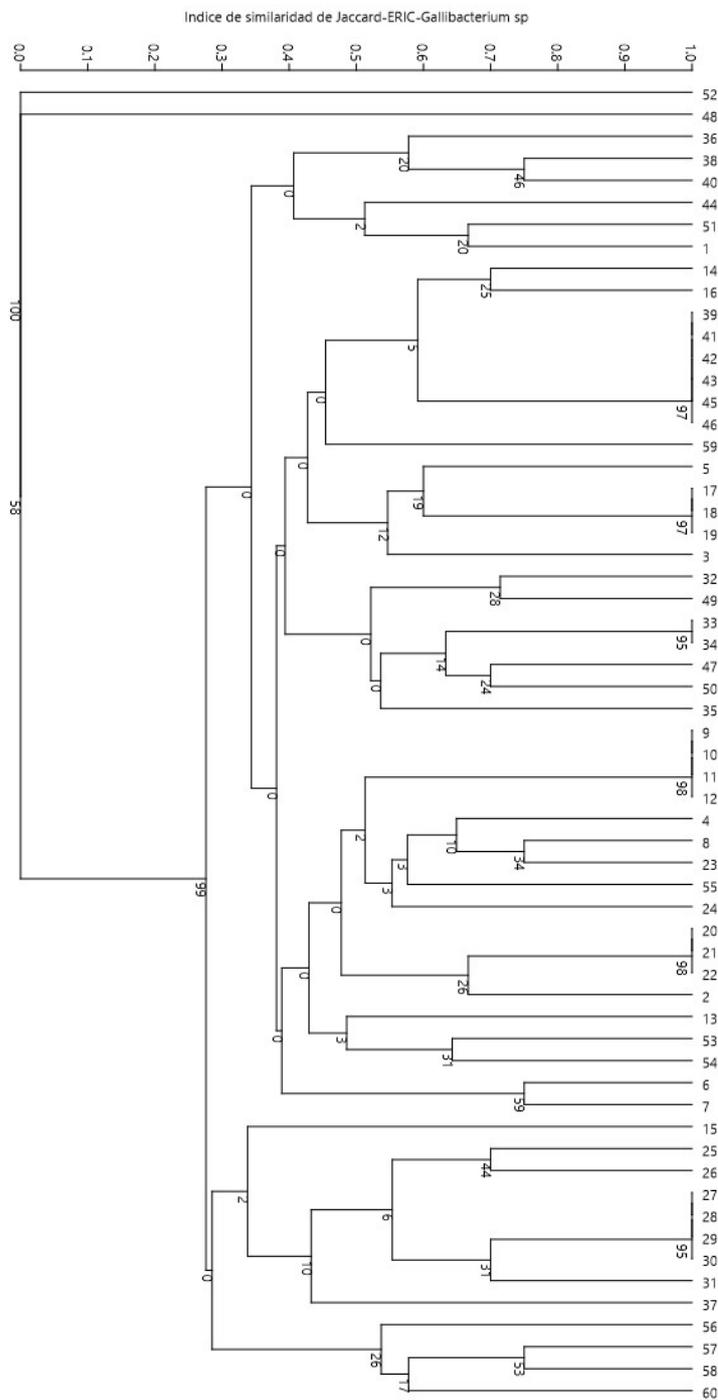


Figura 2. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR). Árbol filogenético de *Gallibacterium* sp mediante el algoritmo paired group de UPGMA obtenido a partir de una matriz bidimensional de ausencia o presencia obtenido a partir de GelAnalyzer v. 2010, aplicando el programa estadístico PAST 3.23 con un similarity index de Jaccard y un bootstraps de 1000 réplicas



Cuadro 2. Genotipificación y multidrogoresistencia de 60 cepas de *Gallibacterium* sp mediante REP, ERIC y BOXAIR, según el año de aislamiento, sistema de producción, órgano y localidad (Parte I)

Cod.	Aislamiento	Sistema de producción	Órgano	Localidad	Resistencia*	REP	ERIC	BOXAIR	PCR
GA01	2014	hyline	senos infra	Trujillo	5	R1	E1	B1	<i>G. genomospecies</i>
GA02	2014	hyline	tráquea	Lima	6	R2	E2	B2	<i>G. anatis</i>
GA03	2014	hyline	cornete	Lima	3	R3	E3	B3	<i>G. anatis</i>
GA04	2015	lohman	senos infra	Trujillo	4	R4	E4	B4	<i>G. anatis</i>
GA05	2015	hyline	senos infra	Lima	5	R2	E5	B5	<i>G. anatis</i>
GA06	2015	lohman	tráquea	Trujillo	3	R2	E6	B6	<i>G. anatis</i>
GA07	2015	lohman	cornete nasal	Lima	2	R5	E7	B7	<i>G. anatis</i>
GA08	2015	hyline	cornete nasal	Lima	0	R6	E8	B8	<i>G. anatis</i>
GA09	2015	hyline	tráquea	Lima	5	R7	E9	B9	<i>G. anatis</i>
GA10	2015	cobb	senos infra	Lima	4	R8	E9	B4	<i>G. anatis</i>
GA11	2015	cobb	tráquea	Lima-	4	R8	E9	B4	<i>G. anatis</i>
GA12	2015	broilers	tráquea	Trujillo	2	R8	E9	B4	<i>G. anatis</i>
GA13	2015	hyline	senos infra	Trujillo	5	R9	E10	B10	<i>G. genomospecies</i>
GA14	2015	broilers	senos infra	Lima	4	R10	E11	B11	<i>G. anatis</i>
GA15	2016	lohman	tráquea	Lima	3	R11	E12	B12	<i>G. anatis</i>
GA16	2016	lohman	senos infra	Lima	3	R10	E13	B13	<i>G. anatis</i>
GA17	2016	broilers	senos infra	Ica	5	R8	E14	B14	<i>G. anatis</i>
GA18	2016	broilers	cornete nasal	Ica	5	R8	E14	B15	<i>G. anatis</i>
GA19	2016	broilers	oído interno	Ica	3	R8	E14	B16	<i>G. anatis</i>
GA20	2016	broilers	tráquea	Lima	6	R12	E15	B17	<i>G. genomospecies</i>
GA21	2016	broilers	sacos aéreos	Lima	4	R8	E15	B18	<i>G. genomospecies</i>
GA22	2016	broilers	cornete nasal	Lima	4	R13	E15	B19	<i>G. genomospecies</i>
GA23	2016	broilers	cornete nasal	Lima	5	R12	E16	B20	<i>G. genomospecies</i>
GA24	2016	broilers	sacos aéreos	Lima	5	R14	E17	B21	<i>G. genomospecies</i>
GA25	2016	broilers	senos infra	Lima	5	R14	E18	B22	<i>G. genomospecies</i>
GA26	2016	broilers	tráquea	Lima	5	R15	E19	B23	<i>G. genomospecies</i>
GA27	2016	cobb	tráquea	Lima	6	R16	E20	B24	<i>G. genomospecies</i>
GA28	2016	cobb	tráquea	Lima	5	R17	E20	B25	<i>G. genomospecies</i>
GA29	2016	cobb	senos infra	Lima	5	R18	E20	B26	<i>G. genomospecies</i>
GA30	2016	cobb	senos infra	Lima	6	R19	E20	B27	<i>G. genomospecies</i>

\* Seis familias de antibióticos: (1) cloranfenícolos, (2) penicilinas, (3) fosfonatos, (4) quinolonas, (5) tetraciclinas, (6) sulfamidas potenciadas

Cuadro 3. Genotipificación y multidrogoresistencia de 60 cepas de *Gallibacterium* sp mediante REP, ERIC y BOXAIR, según el año de aislamiento, sistema de producción, órgano y localidad (Parte II)

Cod.	Aislamiento	Sistema de producción	Órgano	Localidad	Resistencia*	REP	ERIC	BOXAIR	PCR
GA30	2016	cobb	senos infra	Lima	6	R19	E20	B27	<i>G. genomospecies</i>
GA31	2016	hyline	f. ováricos	Trujillo	3	R20	E21	B28	<i>G. anatis</i>
GA32	2016	hyline	tráquea	Lima	4	R21	E22	B29	<i>G. anatis</i>
GA33	2016	hyline	cornete nasal	Lima	4	R22	E23	B30	<i>G. anatis</i>
GA34	2016	hyline	cornete nasal	Lima	4	R23	E23	B31	<i>G. anatis</i>
GA35	2016	bbs	senos infra	Trujillo	6	R24	E24	B32	<i>G. anatis</i>
GA36	2016	bbs	sacos aéreos	Lima	3	R25	E25	B33	<i>G. genomospecies</i>
GA37	2017	ross	tráquea	Lima	5	R26	E26	B34	<i>G. anatis</i>
GA38	2017	hyline	cornete	Lima	5	R27	E27	B35	<i>G. anatis</i>
GA39	2017	hyline	tráquea	Trujillo	5	R28	E28	B36	<i>G. anatis</i>
GA40	2017	hyline	cornete nasal	Lima	4	R29	E29	B37	<i>G. anatis</i>
GA41	2017	hyline	cornete	Lima	3	R8	E28	B38	<i>G. anatis</i>
GA42	2017	hyline	pulmón	Lima	4	R8	E28	B39	<i>G. anatis</i>
GA43	2017	hyline	senos infra	Lima	3	R30	E28	B40	<i>G. anatis</i>
GA44	2017	hyline	cornete nasal	Lima	3	R5	E30	B41	<i>G. anatis</i>
GA45	2017	hyline	senos infra	Lima	4	R31	E28	B42	<i>G. anatis</i>
GA46	2017	ross	tráquea	Lima	4	R32	E28	B43	<i>G. anatis</i>
GA47	2017	hyline	senos infra	Lima	5	R33	E31	B44	<i>G. anatis</i>
GA48	2017	cobb	tráquea	Lima	1	R34	E32	B45	<i>G. anatis</i>
GA49	2017	hyline	tráquea	Lima	1	R8	E33	B46	<i>G. anatis</i>
GA50	2017	hyline	cornete	Trujillo	3	R35	E31	B47	<i>G. anatis</i>
GA51	2017	hyline	senos infra	Trujillo	2	R36	E35	B48	<i>G. anatis</i>
GA52	2017	ross	cornete nasal	Lima	2	R37	E36	B49	<i>G. anatis</i>
GA53	2017	cobb	senos infra	Lima	1	R38	E37	B50	<i>G. anatis</i>
GA54	2018	hyline	senos infra	Lima	3	R39	E38	B34	<i>G. anatis</i>
GA55	2018	cobb	cornete	Lima	4	R40	E39	B51	<i>G. anatis</i>
GA56	2018	cobb	senos infra	Lima	4	R41	E40	B52	<i>G. anatis</i>
GA57	2018	cobb	cornete	Lima	3	R42	E41	B53	<i>G. genomospecies</i>
GA58	2018	hyline	senos infra	Trujillo	2	R43	E42	B54	<i>G. anatis</i>
GA59	2018	ross	sacos aéreos	Lima	6	R44	E43	B55	<i>G. anatis</i>
GA60	2018	cobb	cornete	Lima	6	R45	E44	B56	<i>G. anatis</i>

\* Seis familias de antibióticos: (1) cloranfenícolos, (2) penicilinas, (3) fosfonatos, (4) quinolonas, (5) tetraciclinas, (6) sulfamidas potenciadas

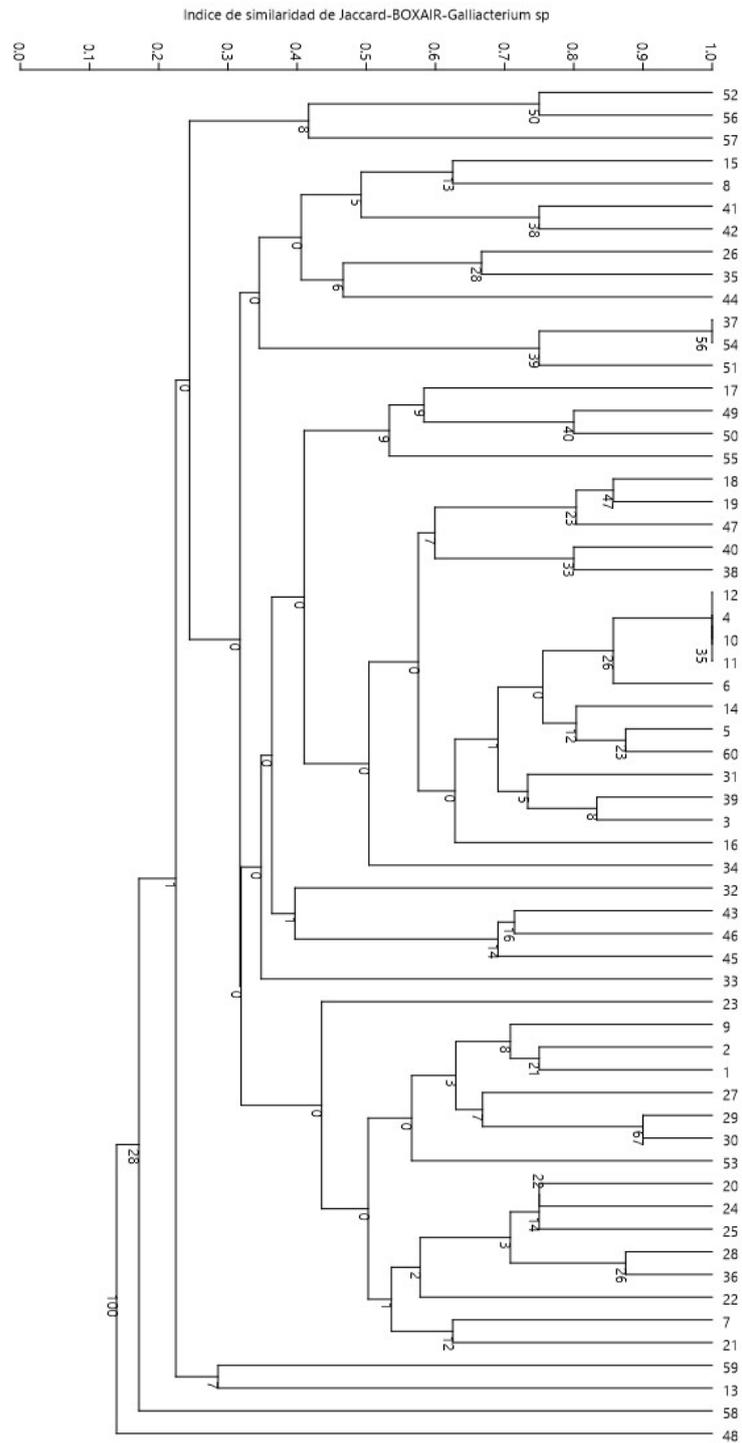


Figura 4. BOXAIR-PCR fingerprinting enterobacterias. Árbol filogenético mediante el algoritmo clásico paired group de UPGMA obtenido a partir de una matriz bidimensional de ausencia o presencia por GelAnalyzer v. 2010. DNA fingerprinting (huella dactilar genética de ADN) de *Gallibacterium* sp aplicando el programa estadístico PAST 3.23 con un similarity index de Jaccard y un bootstraps de 1000 réplicas

## DISCUSIÓN

La avicultura en el Perú está siendo afectada por diversos patógenos bacterianos con nuevas características genéticas, afectando considerablemente la producción de huevos y carne, causando gran mortandad de aves si se asocian con otros microorganismos (Bojesen *et al.*, 2011a). Bacterias altamente variables como *Gallibacterium* sp son un ejemplo de las sufren frecuentes cambios genéticos (Mendoza *et al.*, 2014).

Diversas investigaciones muestran a *Gallibacterium* sp como un patógeno multidrogo resistente a diversos antimicrobianos. Los estudios de Bojesen *et al.*, 2011b indicaron resistencia de *G. anatis* a más de tres antibióticos en el 65% de las cepas de campo; por otro lado, Mendoza *et al.* (2014) encontraron que 96 cepas de *G. anatis* mostraron multiresistencia, tres fueron resistentes a todos los antibióticos estudiados y, el 98% presentó resistencia a la sulfamida, resultado similar a los hallazgos de Bojesen *et al.* (2011a). En el presente estudio, 59/60 cepas mostraron resistencia a por lo menos 1 o más familias de antibióticos, 7/60 fueron multidrogo resistentes a las seis familias del ensayo. Los aislados con mayores perfiles de resistencia fueron las tetraciclinas (Oxitetraciclina 93.33%, 56/60) y las sulfonamidas potenciadas (Sulfatrimetropin 78.33%, 47/60), similar al trabajo de Bojesen *et al.* (2011b). La disminución a la sensibilidad antimicrobiana puede deberse al uso inadecuado de estos, lo cual constituye un riesgo para el control de la bacteria, dando indicios de presencia activa de variabilidad genética continua en *Gallibacterium* sp (Martina *et al.*, 2016)

Estudios de variabilidad genética de *G. anatis* han sido descritos en varios países de Europa así como en Perú (Bojesen *et al.*, 2003a,b,c; Christensen *et al.*, 2003, 2004; Bojesen y Shivaprasad, 2007a; Bojesen *et al.*, 2007b; Christensen y Bisgaard, 2010; Mendoza *et al.*, 2014), donde encuentran 24

biovars: la subespecie *haemolytica* comprende los biovars 1-4, 6, 7, 10-24; la subespecie *anatis* el biovar Pa; *genomospecies 1* el biovar 5 y 8; y la *genomospecie 2* el biovar 9. De estos, Pa es el más frecuente, seguido de los biovars hemolíticos 1, 3, 4, 12 y 18 (Mendoza *et al.*, 2014). Estos estudios manifiestan la gran actividad genética presente en *Gallibacterium* sp, exigiendo el desarrollo y uso de metodologías alternativas a las convencionales que permitan identificar en forma oportuna el agente infeccioso mutante para el control y la producción de autovacunas efectivas.

En el Perú no existe información sobre la variabilidad genotípica en cepas de *Gallibacterium* sp basadas en amplificación patrones VNTRS mediante REP, ERIC Y BOXAIR, con excepción del estudio de Mendoza *et al.* (2014), utilizando ERIC-PCR en los aislamientos de *G. anatis*. El método demostró ser altamente discriminatorio y útil para la evaluación epidemiológica, logrando identificar 24 genotipos en las 96 cepas. La aplicación de las tres técnicas de tipificación demostraron ser extremadamente confiables, reproducibles, rápidas y altamente discriminatorias en otros países como Brasil y EEUU, logrando tipificar aislados de *Salmonella enteritidis*, especialmente con los basados en la VNTRS (Versalovic *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2007). En forma similar, en el presente estudio la PCR fingerprinting utilizando los tres cebadores mostró distintos perfiles o patrones de bandeos en la mayoría de los aislamientos.

La REP-PCR presentó 45 perfiles (R1-R45) determinando 45 genotipos, además de 4 clados. Además, se determinaron seis grupos con perfiles genéticos idénticos circulares en Lima, Libertad e Ica. La ERIC-PCR presentó 44 perfiles (E1-E44) determinando 44 genotipos, 5 clados, y 6 grupos con perfiles genéticos idénticos dispersos en Lima, Libertad e Ica. La BOXAIR presentó 56 perfiles (B1-B56) determinando 56 genotipos, 8 clados, y 2 grupos con perfiles genéticos idénticos dispersos en Lima y Libertad. Las

tres técnicas de genotipificación podrían dar pistas sobre una alta variabilidad existente en *Gallibacterium* spp, lo que sugiere su origen común, pero hay que tener en cuenta la presencia de dos especies dentro del estudio: *G. anatis* y *G. genomospecies*. Los resultados demuestran que existe una diversidad genética en el linaje clonal en la mayoría de los aislados de las dos especies, además de actividad genética y variabilidad intra e interespecífica en las cepas de *Gallibacterium* sp. Este hallazgo implica que se podría influir o incrementar la capacidad patógena por cada genotipo nuevo (Bojesen y Shivaprasad, 2007a; Neubauer *et al.*, 2009).

Los perfiles de DNA detectados por las técnicas de REP y ERIC demuestran moderado nivel discriminatorio y los perfiles de DNA de BOXAIR demostraron ser altamente discriminatorios al determinar 56/60 genotipos. Por otro lado, no se pudo rastrear si la diversidad clonal presente estaba correlacionada según el órgano de aislamiento, año o lugar de aislamiento; sin embargo, si hubo presencia de correlación en la mayoría de los genotipos, con el aumento de la resistencia antimicrobiana, en por lo menos de una familia de antibióticos. La aplicación de los tres métodos de tipificación para las 60 muestras de *Gallibacterium* sp en los aislados de aves mostraron perfiles únicos, lo que sugiere que la fuente bacteriana originaria de la diversidad clonal es la misma especie y también la interacción o asociación con otras bacterias estrechamente relacionadas (Paudel *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONES

La rep-PCR (REP, ERIC y BOXAIR) realizada como se describe en el presente estudio fue útil para la tipificación de *Gallibacterium* sp, dado que fue capaz de discriminar aislamientos potencialmente diferentes de las ciudades de Lima, Libertad y Ica. Sin embargo, el uso combinado de métodos genotípicos y fenotípicos permitió una discriminación más precisa entre aislamientos.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado y ejecutado en las instalaciones de la empresa Bioservice SRL. Los autores agradecen a los médicos veterinarios Rosario Condori, Stephane Lovón y Manuel Silvera por el apoyo logístico, sugerencias y revisión del manuscrito.

## LITERATURA CITADA

1. **Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jauferally-Fakim Y. 2009.** Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. *Infect Genet Evol* 9: 322-327. doi: 10.1016/j.meegid.2007.12.003
2. **Ataei S, Bojesen A, Amininajafi F, Ranjbar M, Banani M, Afkhamnia M, Abtin A, et al. 2017.** First report of *Gallibacterium* isolation from layer chickens in Iran. *Arch Razi Institute* 72: 125-130. doi: 10.22092/ari.2017.109842
3. **Bojesen AM, Vasquez ME, Bager RJ, Ifrah D, Gonzalez C, Aarestrup FM. 2011a.** Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol* 148: 105-110. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.011
4. **Bojesen AM, Bager RJ, Ifrah D, Aarestrup FM. 2011b.** The rarely reported tet(31) tetracycline resistance determinant is common in *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol* 149: 497-499. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.11.015
5. **Bojesen A, Shivaprasad H. 2007a.** Genetic diversity of *Gallibacterium* isolates from California turkeys. *Avian Pathol* 36: 227-230. doi: 10.1080/03079450701332352
6. **Bojesen AM, Vásquez ME, Robles F, Gonzales C, Soriano EV, Olsen JE, Christensen H. 2007b.** Specific identification of *Gallibacterium* by PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. *Vet Microbiol* 123:

- 262-268. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.-02.013
7. **Bojesen A, Christensen H, Nielsen O, Olsen J, Bisgaard M. 2003a.** Detection of *Gallibacterium* spp in chickens by fluorescent 16S rRNA *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 41: 5167-5172.
  8. **Bojesen AM, Torpdahl M, Christensen H, Olsen JE, Bisgaard M. 2003b.** Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. *J Clin Microbiol* 41: 2737-2740.
  9. **Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M. 2003c.** Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathol* 32: 503-10. doi: 10.1080/030794-5031000154107
  10. **Christensen H, Bisgaard M. 2010.** Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of *Pasteurellaceae* of veterinary importance. *Berl Munch Tierarztl* 1: 20-30. doi: 10.2376/0005-9366-123-20
  11. **Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE, Bisgaard M. 2004.** Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Micr* 54: 1601-1609. doi: 10.1099/ijs.0.03018-0
  12. **Christensen H, Bisgaard M, Bojesen A, Mutters R, Elmerdahl J. 2003.** Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, «*Actinobacillus salpingitidis*» or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Micr* 53: 275-287. doi: 10.1099/ijs.0.02330-0
  13. **Hammer Ø, Harper D, Ryan P. 2001.** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electr* 4: 9 p. [Internet]. Available in: [https://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf)
  14. **Martina P, Mazur F, Cazzola L, Prieto C, Pérez S, Quiroga M, Yantorno O, et al. 2016.** Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from adult cystic fibrosis patients in Argentina. *Recyt* 25: 4-10.
  15. **Mendoza K, Zavaleta A, Koga Y, Rodríguez J, Alvarado A, Tinoco R. 2014.** Variabilidad genética de cepas de *Gallibacterium anatis* aisladas de aves comerciales del Perú con infecciones respiratorias. *Rev Inv Vet Perú* 25: 233-244. doi: 10.15381/rivep.v25i2.8496
  16. **Neubauer C, De Souza-Pilz M, Bojesen AM, Bisgaard M, Hess M. 2009.** Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. *Avian Pathol* 38: 1-7. doi:10.1080/03079450-802577848
  17. **Neubauer C, Souza-Pilz M, Bojesen A, Bisgaard M, Hess M. 2009.** Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. *Avian Pathology*, - 38(1), 1-7. doi:10.1080/030794508025-77848
  18. **Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico. 1993.** Normas de funcionamiento de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de disco. Estándar aprobado. Documento NCCLS M2-A5 Wayne, Pa: Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87384/#B27>
  19. **Oliveira S, Bessa M, dos Santos L, Cardoso M. 2007.** Phenotypic and genotypic characterization of *salmonella enteritidis* isolates. *Braz J Microbiol* 38: 720-728. doi: 10.1590/S1517-83822007-000400025
  20. **Osuna CR, Molina BR, Hernández CJ, Robles MJ, Icedo EJG, Acuña YM. 2017.** First report of biovar 6 in

- birds immunized against *Gallibacterium anatis* in poultry farms located in Sonora, México. *Vet Méx* 4: 2-9. doi: 10.21753/vmoa.4.3.389
21. **Paudel S, Hess M, Hess C. 2017.** Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Gallibacterium anatis* in specific-pathogen-free chickens complicates clinical signs of infectious coryza, which can be prevented by vaccination. *Avian Dis* 61: 55-63. doi: 10.1637/11481-081016-reg
22. **Singh S, Singh B, Sinha D, Kumar OR V, Vadhana P, Bhardwaj M, Sakshi D. 2015.** *Gallibacterium anatis*: an emerging pathogen of poultry birds and domiciled birds. *J Vet Sci Technol* 7: 324. doi: 10.4172/2157-7579.1000324
23. **Versalovic J, Schneider M, Bruijn FJ, Lupski, J. 1994.** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Method Mol Cell Biol* 5: 25-40.
24. **Wang C, Pors S, Olsen R, Bojesen A. 2018.** Transmission and pathogenicity of *Gallibacterium anatis* and *Escherichia coli* in embryonated eggs. *Vet Microbiol* 217: 76-81. doi: 10.1016/j.vetmic.-2018.03.005