

Glaesserella parasuis : serotipos y virulencia de cepas aisladas de cerdos en Itapúa-Paraguay entre febrero del 2022 a marzo del 2023

Glaesserella parasuis: serotypes and virulence of strains isolated from pigs in Itapúa-Paraguay between February 2022 and March 2023

Nadia Denisse Zaracho Paniagua^{1*}, Yasmine Maluff Ladan¹, Liliana Noelia Talavera Stefani^{1,2}, Yanina Dionisia Sapper Lacy¹, Carolina Elizabeth Prendeski Storaluk¹, Eliane Aya Nishii Encina^{1*}

¹Biosyntech S. A. Área de Investigación y desarrollo e Innovación. Fram-Paraguay.

²Universidad Nacional de Itapúa. Facultad de Ciencias y Tecnología. Itapúa-Paraguay.



doi 10.57201/IEUNA2313373

Sección: Artículo Original

*Autores correspondientes:
aya@biosyntech.com.py,
carolina@biosyntech.com.py

Editor de área:

Andrea A. Arrúa Alvarenga¹,
Universidad Nacional de
Asunción. Centro Multidisciplinario
de Investigaciones Científicas y
Tecnológicas (CEMIT). San
Lorenzo, Paraguay

Editor invitado:

Guillermo Enciso¹, Centro de
Desarrollo e Innovación Tecnológica
(CEDIT). Hohenau, Paraguay

Recibido:

28 de abril de 2023

Aceptado:

19 de junio de 2023

Recibido en versión modificada:

19 de junio de 2023

Corregido:

28 de diciembre de 2023

Este es un artículo publicado en
acceso abierto bajo una Licencia
Creative Commons "CC BY

4.0".

Declaración de conflicto: Los
autores declaran no tener conflicto
de interés.

e-ISSN 2709-0817

Como citar: Zaracho Paniagua,
N. D., Maluff Ladan, Y., Talavera
Stefani, L. N., Sapper Lacy, Y. D.,
Prendeski Storaluk, C. E. y Nishii
Encina, E. A. (2023). *Glaesserella
parasuis*: serotipos y virulencia de
cepas aisladas de cerdos en
Itapúa-Paraguay entre febrero del
2022 a marzo del 2023. *Revista
investigaciones y estudios - UNA*,
14 (1), 84-89.

Resumen. *Glaesserella parasuis* es habitualmente encontrada en el tracto respiratorio de cerdos, aunque existen cepas asociadas a enfermedades sistémicas severas, causantes de pérdidas económicas a nivel mundial. Existen 15 serotipos caracterizados asociados a diferentes grados de virulencia. En Paraguay, se desconocen los serotipos circulantes. El objetivo de este trabajo fue identificar serotipos de *G. parasuis* presentes en el Departamento de Itapúa. Se incluyeron 62 cerdos con síntomas respiratorios provenientes de cinco granjas productoras de porcinos de Itapúa durante el mes de febrero del 2022 a marzo del 2023. Los aislados se realizaron a partir de muestras de pulmón y de cornetes colectadas en necropsias e hisopados nasales en animales vivos. Las muestras se cultivaron en Agar Chocolate + NAD, tras 48 hs de incubación a 37°C se realizaron pruebas bioquímicas a las colonias sospechosas, posteriormente se realizó la extracción de ADN a las confirmadas, seguido de PCR multiplex utilizando cebadores para cada uno de los serotipos y un par específico de la especie. En todas las granjas se identificó la presencia de *G. parasuis*, un total de 12 cepas, entre las que se encontraban el Serotipo 2 (1), Serotipo 3 (3), Serotipo 7 (1), Serotipo 8 (1) y otras Serotipo no determinado (6), identificándose la presencia del gen de virulencia VtaA en todas las cepas aisladas, excepto la correspondiente al Ser8. De esta manera, este trabajo se convierte en el primer reporte de serotipos de *G. parasuis* en Itapúa-Paraguay.

Palabras clave: enfermedad de Glässer, PCR multiplex, serotipado molecular.

Abstract. *Glaesserella parasuis* is usually found in the respiratory tract of pigs, although there are strains associated with severe systemic diseases, causing economic losses worldwide. There are 15 characterized serotypes associated with different degrees of virulence. In Paraguay, the circulating serotypes are unknown. The objective of this work was to identify *G. parasuis* serotypes present in the Department of Itapúa. A total of 62 pigs with respiratory symptoms from five pig production farms in Itapúa were included during the month of February 2022 to March 2023. The isolates were made from lung and turbinate samples collected at necropsies and nasal swabs from live animals. The samples were cultured in Chocolate Agar + NAD, after 48 hours of incubation at 37°C, biochemical tests were performed on the suspected colonies, then DNA extraction was performed on the confirmed ones, followed by multiplex PCR using specific pair of primers for each serotype and species. In all farms, the presence of *G. parasuis* was identified, on a total of 12 strains, including Serotype 2 (1), Serotype 3 (3), Serotype 7 (1), Serotype 8 (1) and others Non-typeable (6), identifying the presence of the VtaA virulence gene in all the isolated strains, except the one corresponding to SV8. Thus, this work becomes the first report of *G. parasuis* serotypes in Itapúa-Paraguay.

Keywords: Glässer's disease, multiplex PCR, molecular serotyping.

Introducción

Glaesserella parasuis puede encontrarse como comensal colonizante del tracto respiratorio superior de los cerdos, aunque también es un patógeno bacteriano de importancia en el sector porcino. Es agente etiológico de la enfermedad de Glässer, y patógeno secundario del Complejo Respiratorio Porcino (Costa-Hurtado et al., 2020; Schuwerk et al., 2020). Las infecciones descontroladas producidas por *G. parasuis* resultan en pérdidas económicas significativas en el sector porcino, causadas por diferentes variables como atraso en el crecimiento, aumento en el índice de conversión alimentaria, disminución en la ganancia de peso diario, costos derivados del uso de antimicrobianos, depreciación de las carcasas y altas tasas de mortalidad (Frاندoloso & Resende de Macebo, 2022).

Las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas con la enfermedad de Glässer pueden variar del 5 al 10%, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y virulencia de la cepa de *G. parasuis* implicada (Aragon et al., 2019). La enfermedad generalmente inicia de forma súbita presentando síntomas tales como anorexia, fiebre, apatía, estornudos, tos, disnea, cianosis, conjuntivitis, claudicación o signos nerviosos, los lechones afectados pueden morir durante la forma aguda o evolucionar a la forma crónica en la que se observan artritis crónica y adherencias en las serosas. Las lesiones comúnmente observadas corresponden a pleuritis, pericarditis, peritonitis, oftalmítis, poliartritis y meningitis con exudado fibrinoso o serofibrinoso (Frاندoloso & Resende de Macebo, 2022).

Se han descrito 15 serotipos (Ser) con diferentes grados de virulencia, siendo considerados de alta virulencia a Ser1, Ser5, Ser10, Ser12, Ser13 y Ser14; moderada virulencia a Ser2, Ser4, Ser8 y Ser15, y baja virulencia a Ser3, Ser6, Ser7, Ser9 y Ser11. Además, actualmente existe un porcentaje de aislados que no se pueden serotipificar (Olvera et al., 2012; Pires Espíndola et al., 2019; Schuwerk et al., 2020).

De esta manera resulta clave la identificación de las serovariedades asociadas con brotes regionales para el desarrollo de estrategias preventivas en cada región productora de cerdos, que permitan el desarrollo de vacunas que contengan antígenos para los serovares locales más prevalentes (Pires Espíndola et al., 2019), lo que a su vez ayuda a limitar el uso de antimicrobianos en la producción porcina. Estudios epidemiológicos en regiones productoras de cerdos de varios países demuestran la circulación de un grupo heterólogo de serotipos, siendo los serotipos 4 y 5 los más prevalentes en la mayoría de los países con alta producción porcina (Pires Espíndola et al., 2019). En Paraguay, no hay estudios sobre la prevalencia y distribución de los serotipos de *G. parasuis* circulantes en el país, conocimiento necesario para poder plantear estrategias de control y manejo de esta especie.

Materiales y métodos

Muestreo. El muestreo incluyó cinco granjas productoras de porcinos ubicadas en el departamento de Itapúa desde el mes de febrero del 2022 a marzo del 2023 (Figura 1). Se identificaron cerdos con síntomas respiratorios, incluyéndose un total de 62 animales. En la figura 1, se observa la geoposición de las granjas incluidas en el trabajo. En animales vivos se aplicaron métodos de sujeción adecuados, las fosas nasales fueron higienizadas y las muestras fueron colectadas con hisopos estériles en medio de transporte semisólido Stuart. Para animales

muestras de pulmón o de cornetes durante las necropsias realizadas a campo, antes de las cinco horas post mortem. La cantidad de muestras por granja se especifica en la Figura 2.

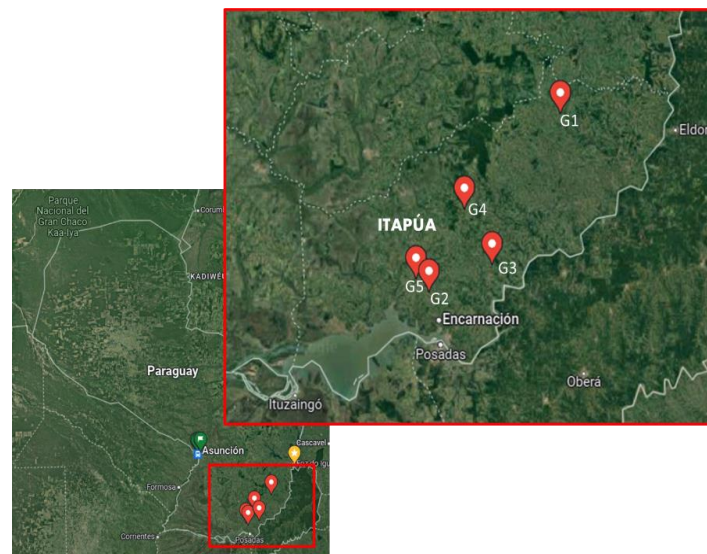


Figura 1. Ubicación geográfica de las granjas incluidas en el estudio.

Cultivo y aislamiento de microorganismos. Las muestras fueron colectadas en las granjas y transportadas al laboratorio, sembradas en Agar columbia Chocolate + NAD e incubadas por 48 hs a 37°C en atmósfera de microaerofilia. Se realizó tinción de Gram a las colonias sospechosas, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas como Indol, Urea y Test de catalasa (Frاندoloso & Resende de Macebo, 2022).

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN se tomaron colonias crecidas en placa y fueron suspendidas en 200 µL de solución PBS, se agitó con vórtex, y posteriormente se utilizó el kit de purificación GeneJET™ Viral DNA/RNA (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermoscientific, 2021).

Tipificación molecular y virulencia. Para realizar la tipificación molecular se utilizaron los cebadores descritos por Howell (2015), con modificaciones hechas por Lacouture et al. (2017). Cada reacción de PCR consistió en 12,5 µL de 2x GoTaq® G2 Colorless Master Mix (Promega); 1 mM de cada uno de los cebadores, csp de agua libre de nucleasas y 2 µL de ADN extraído, con un volumen final de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron las mismas descritas por Lacouture et al., (2017). Para identificar la presencia de genes relacionados a virulencia se utilizó la metodología descrita por Galofré-Mila et al., (2017) para la amplificación de genes de virulencia vtaA.

Análisis de los datos: Se clasificaron los resultados teniendo en cuenta la granja de procedencia, los mismos fueron analizados con estadística descriptiva, utilizando el Software RStudio 2022.07.0.

Resultados y discusión

Se identificó la presencia de *G. parasuis* en las 5 granjas incluidas en este estudio (Figura 2). Un total de 12 cepas fueron aisladas, identificándose el serotipo al que pertenecen el 50% (6/12) de los aislados, perteneciendo a cuatro de los 15 (Ser2, Ser3, Ser7 y Ser8) serotipos reconocidos, no correspondiendo los demás aislados a ningún serotipo conocido actualmente, identificándose como NT (No Tipificables, Figura 2 y 3), correspondiéndose

con lo reportado para otros países (Pires Espíndola et al., 2019; Schuwerk et al., 2020), lo cual estaría indicando la posible existencia de más serotipos que los 15 únicos reportados actualmente, evidenciando la necesidad de estudiar estas cepas NT. No se logró verificar la presencia de los serotipos 4 y 5, considerados como los más prevalentes en la mayoría de los países con alta producción porcina (Pires Espíndola et al., 2019). Es importante destacar que el 80,65% de las muestras sintomáticas, fueron ocasionadas por otras etiologías (OE), causadas por otros agentes. *G. parasuis* es una especie bacteriana heterogénea que comprende cepas con amplias diferencias en virulencia. Esta dualidad debe tenerse en cuenta a la hora de diagnosticar y controlar la enfermedad (Costa-Hurtado et al., 2020). Es importante destacar que, prácticamente cada granja presentó un serotipo específico, pudiendo esto relacionarse a la procedencia de los cerdos, como lo reportado en otros países productores (Pires Espíndola et al., 2019). Considerando la alta diversidad antigénica intrínseca de las diferentes serovariedades de este microorganismo, es imprescindible caracterizar minuciosamente las cepas envueltas en los casos para desarrollar vacunas adecuadas que a su vez ayuden a reducir la utilización de antimicrobianos de forma preventiva y disminuyan las probabilidades de crear resistencias en cepas clínicas como ya ocurre en Brasil (Frandoloso y Resende de Macebo, 2022).

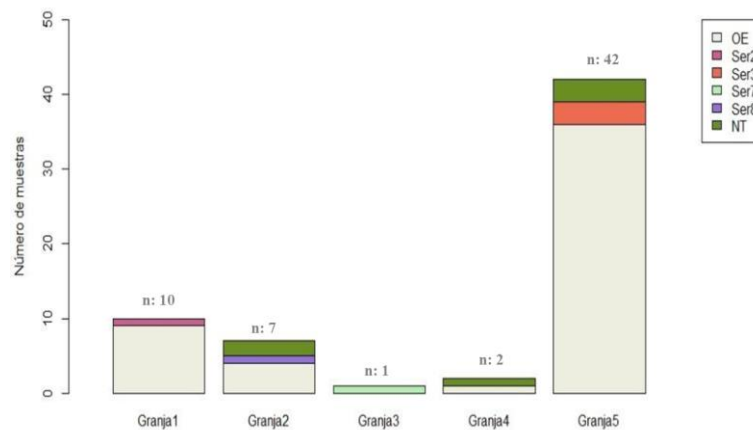


Figura 2. Distribución de muestras y serotipos encontrados en cada una de las granjas. **OE:** Otra etiología, *G. parasuis*: **Ser2:** Serotipo 2, **Ser3:** Serotipo 3, **Ser7:** Serotipo 7, **Ser8:** Serotipo 8, **NT:** No tipificable.

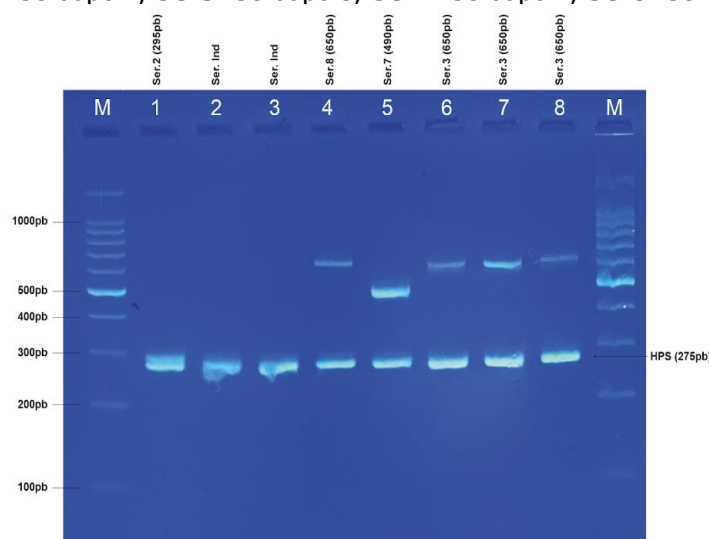


Figura 3. Perfil de la PCR multiplex para cada uno de los aislados de *G. parasuis* encontrados. Agarosa al 2%. M: marcador molecular; 1-8: muestras.

En cuanto a la identificación de genes relacionados a virulencia, los resultados indicaron que la amplificación del gen VtaA dio positivo en 11 de 12 de los aislados bacterianos. Aquellas que fueron positivas se obtuvieron de muestras de pulmón (9/11, 82%), cornetes (1/11, 9%) e hisopado nasal (1/11, 9%). La única cepa que dio negativo para el gen de virulencia se obtuvo de una muestra de hisopado nasal. Estos resultados sugieren que la mayoría de los aislamientos estudiados positivos al gen VtaA pueden presentar mecanismos de resistencia al suero y a la fagocitosis. Estos dos mecanismos se han reconocido como importantes factores de virulencia en la enfermedad causada por *G. parasuis* (Cerdà-Cuéllar & Aragon, 2008; Olvera et al., 2012).

De esta manera, se logró identificar la presencia y serotipificar los aislados de *G. parasuis* en cerdos con síntomas respiratorios procedentes de 5 granjas dedicadas a la producción porcina en Itapúa, Paraguay. Si bien los serotipos circulantes están clasificados dentro de los grupos de moderada y baja virulencia todos fueron aislados de animales sintomáticos, y en casi el total de los 12 aislados fue identificado el gen de virulencia VtaA.

De esta manera, este trabajo se convierte en el primer reporte de serotipos de *G. parasuis* en Itapúa-Paraguay, conocimiento fundamental para el control y manejo de este patógeno.

Contribución de autores

Concepción del estudio: N.D.Z.P., C.E.P.S., E.A.N.E. **Diseño del experimento:** N.D.Z.P., L.N.T.S., C.E.P.S., E.A.N.E. **Ejecución del experimento:** N.D.Z.P., Y.M.L., Y.D.S.L. **Verificación del experimento:** N.D.Z.P., Y.D.S.L. **Análisis/interpretación de datos:** N.D.Z.P., **Análisis estadísticos:** N.D.Z.P., L.N.T.S. **Preparación del manuscrito:** N.D.Z.P., Y.M.L., L.N.T.S. **Edición y revisión del manuscrito:** L.N.T.S., C.E.P.S., E.A.N.E. **Aprobación de la versión final del manuscrito:** L.N.T.S., C.E.P.S., E.A.N.E.

Fuente de Financiamiento. Sin financiamiento externo.

Referencias Bibliográficas

- Aragon, V., Segalés, J. & Tucker, A. W. (2019). Glässer's Disease. In *Diseases of swine* (pp. 844–853).
- Cerdà-Cuéllar, M. & Aragon, V. (2008). Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine. *Veterinary Journal*, 175(3), 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.01.016>
- Costa-Hurtado, M., Barba-Vidal, E., Maldonado, J., & Aragon, V. (2020). Update on Glässer's disease: How to control the disease under restrictive use of antimicrobials. *Veterinary Microbiology*, 242 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108595>
- Frndoloso, R., & Resende de Macebo, N. (2022). Doença de Glässer. In R. M. C. Guedes & D. Barcellos (Eds.), *Doenças dos Suínos* (Tercera, pp. 196–207).
- Galofré-Milà, N., Correa-Fiz, F., Lacouture, S., Gottschalk, M., Strutzberg-Minder, K., Bensaid, A., Pina-Pedrero, S., & Aragon, V. (2017). A robust PCR for the differentiation of potential virulent strains of *Haemophilus parasuis*. *BMC Veterinary Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1041-4>
- Howell, K. J., Peters, S. E., Wang, J., Hernandez-Garcia, J., Weinert, L. A., Luan, S. L., Chaudhuri, R. R., Angen, Aragon, V., Williamson, S. M., Parkhill, J., Langford, P. R., Rycroft, A.N., Wren, B. W., Maskell, D. J., Tucker, A. W. & Consortium, D. J. (2015). Development of a multiplex PCR assay for rapid molecular serotyping of *Haemophilus parasuis*. *Journal of clinical microbiology*, 53(12), 3812-3821.

- Lacouture, S., Rodriguez, E., Strutzberg-Minder, K. & Gottschalk, M. (2017). Canada: Serotyping of *Haemophilus parasuis* field isolates from disease pigs in Quebec by indirect hemagglutination assay and multiplex polymerase chain reaction (PCR). *The Canadian Veterinary Journal*, 58(8), 802.
- Olvera, A., Pina, S., Macedo, N., Oliveira, S., Aragon, V. & Bensaid, A. (2012). Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (vtaA). *Veterinary Journal*, 191(2), 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.12.014>
- Pires Espíndola, J., Balbinott, N., Trevisan Gressler, L., Machado, G., Silene Klein, C., Rebelatto, R., Gutiérrez Martín, C. B., Kreutz, L. C., Schryvers, A. B. & Frandoloso, R. (2019). Molecular serotyping of clinical strains of *Haemophilus* (*Glaesserella*) *parasuis* brings new insights regarding Glässer's disease outbreaks in Brazil. *PeerJ*, 7, e6817. <https://doi.org/10.7717/peerj.6817>
- Schuwerk, L., Hoeltig, D., Waldmann, K. H., Strutzberg-Minder, K., Valentin-Weigand, P. & Rohde, J. (2020). Serotyping and pathotyping of *Glaesserella parasuis* isolated 2012–2019 in Germany comparing different PCR-based methods. *Veterinary Research*, 51(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00862-1>
- Thermoscientific. (2021). *GeneJET Viral DNA RNA Purification User Guide*.

Fe de erratas

En el artículo "Glaesserella parasuis: serotipos y virulencia de cepas aisladas de cerdos en Itapúa-Paraguay entre febrero del 2022 a marzo del 2023", con número DOI: <https://doi.org/10.57201/IEUNA2313373>, publicado en la Revista investigaciones y estudios-UNA , 14(1):84-89.

Los autores se disculpan sinceramente por el error involuntario en la composición tipográfica en la página 87, sección Materiales y Métodos.

El contenido completo de dicha sección debe ser el siguiente, la inclusión se visualiza en negrita:

Tipificación molecular y virulencia. Para realizar la tipificación molecular se utilizaron los cebadores descritos por Howell (2015), con modificaciones hechas por Lacouture et al. (2017). **Fueron utilizadas tres mezclas de cebadores que se detallan a continuación: PM1: funB (Ser1), glyC (Ser3), wciP (Ser4), funQ (Ser7), funAB (Ser14); PM2: wzx (Ser2), funV (Ser9), gltP (Ser13), funI (Ser15) y PM3: wcwK (Ser5/12), gltI (Ser6), scdA (Ser8), funX (Ser10), amtA (Ser11).** Cada reacción de PCR consistió en 12,5 µL de 2x GoTaq® G2 Colorless Master Mix (Promega); 1 mM de cada uno de los cebadores, csp de agua libre de nucleasas y 2 µL de ADN extraído, con un volumen final de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron las mismas descritas por Lacouture et al., (2017). Para identificar la presencia de genes relacionados a virulencia se utilizó la metodología descrita por Galofré-Mila et al., (2017) para la amplificación de genes de virulencia vtaA.