

Determinación de la presencia de ácido hialurónico en el material capsular de cepas de *Pasteurella multocida* tipos A y D aisladas de pulmones de cerdo

José Angel Gutiérrez Pabello*
John E. Smith**

Resumen

Se aislaron 20 cepas de *P. multocida* de pulmones de cerdo. Siete cepas lisas pertenecieron al grupo capsular D, mientras que 12 cultivos de la variedad mucoide y uno con colonias lisas se clasificaron como serotipo A por la prueba de hemoaglutinación indirecta (HI). Se usó una prueba de cromatografía en papel para detectar la presencia de ácido hialurónico. El material capsular de todas las cepas usadas en el estudio mostró un patrón de movimiento al mismo nivel que el ácido hialurónico purificado. Los cultivos del serogrupo A mostraron una mancha más clara y grande que los cultivos del serogrupo D. Los resultados sugieren que el material capsular de las cepas del grupo D pueden contener ácido hialurónico como las del serotipo A, o que pueden tener una substancia diferente que migra al mismo nivel.

Introducción

Se ha identificado a *P. multocida* en más de 40 especies de mamíferos y alrededor de 60 especies de aves.⁹

Los factores de virulencia en este microorganismo se asocian a la adherencia bacteriana, la formación de toxinas y enzimas y la presencia de cápsula.^{3, 11, 16, 17, 21}

La cápsula puede ser responsable de la adherencia selectiva que muestran algunas bacterias hacia diferentes substratos incluyendo superficies inertes y células epiteliales. Esta estructura bloquea físicamente los antígenos de superficie presentes en la pared bacteriana, evitando así la acción de los anticuerpos. De igual manera promueve la resistencia de las bacterias a infecciones por bacteriófagos al ocultar los receptores específicos para estos virus, e inhibe el acceso de los receptores que la célula fagocítica tiene para adherirse al componente C3B del complemento.^{8, 20}

Por otra parte, los microorganismos encapsulados son resistentes a la activación del complemento por la

vía alterna. Estudios recientes han demostrado que algunos polisacáridos capsulares como el ácido siálico tienen una alta afinidad por las proteínas inhibidoras de la vía alterna del complemento promoviendo una opsonización deficiente, lo cual convierte al organismo capsulado resistente a la opsonofagocitosis en ausencia de anticuerpos.^{8, 13, 16, 20}

P. multocida ha sido clasificada serológicamente en 5 grupos (A, B, D, E y F) con base en sus antígenos capsulares.^{1, 2, 3} Los serotipos A y D se relacionan con problemas neumónicos y de rinitis atrófica en cerdos.^{5, 12, 14, 19, 22}

El ácido hialurónico es el principal componente del material capsular de *P. multocida* tipo A, en cambio la naturaleza de la cápsula del tipo D aún no se estudia completamente.^{4, 10, 16, 18, 21}

El propósito de este estudio fue determinar la presencia del ácido hialurónico en el material capsular de *P. multocida* tipo D con una técnica de cromatografía en papel.

Material y métodos

Cepas de *P. multocida*. Se colectaron 35 pulmones de cerdo enviados al rastro. Todas las muestras se inocularon en agar sangre utilizando la cara interna de un trozo de pulmón obtenido estérilmente. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h. Las colonias sospechosas se resembraron para purificarlas. La identificación se realizó mediante técnicas bacteriológicas estándar: Tinción de Gram, producción de oxidasa, catalasa, indol, ureasa, fermentación de carbohidratos y crecimiento en TSI y agar McConkey.^{1, 3}

Se utilizó una prueba de hemoaglutinación indirecta para la serotipificación de *P. multocida*.

HI-Preparación de los glóbulos rojos. Los eritrocitos de ovino se lavaron 6 veces, se resuspendieron en solución amortiguada de fosfatos (PBS) a una concentración del 10%, se enfriaron a 4°C y se mezclaron con un volumen igual de glutaraldehído al 1% en PBS. Luego se agitaron a 4°C por 30 min y se centrifugaron a 1500 gravedades durante 10 min. El botón de glóbulos rojos se lavó 3 veces y se resuspendió a una concentración del 10% en PBS adicionado de 0.1% de azida de sodio. Las células así tratadas se conservaron a 4°C hasta su uso.

Recibido para su publicación el 9 de abril de 1992

* Departamento de Bacteriología y Micología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510, México, D.F.

** Department of Microbiology, University of Surrey. Guildford, Surrey GU2 5XH, England.

HI-Antígeno. El crecimiento total de *P. multocida* en agar extracto de levadura cistina se suspendió en 1 ml de PBS 0.02M pH 7.2, mezclado con un volumen igual de PBS suplementado con 200 U/ml de hialuronidasa,* se calentó a 100C durante 60 min y se centrifugó a 4500 gravedades por 20 min. El sobrenadante constituyó el antígeno.

HI-Sensibilización de los glóbulos rojos. Se incorporaron volúmenes iguales de eritrocitos tratados con glutaraldehído y de antígeno. La mezcla se incubó a 37C por 1 h con agitación cada 15 min. Los glóbulos rojos sensibilizados se lavaron 3 veces y se suspendieron en PBS con 0.25% de albúmina sérica bovina** quedando a una concentración final de 0.5%.

HI-Antisueros. Se utilizaron sueros anti-*P. multocida* grupos A y D.

HI-Desarrollo de la prueba. Se realizaron diluciones dobles de los antisueros (1/2 - 1/4096) en PBS con 0.25% de albúmina sérica bovina en volúmenes de 50 µl, usando placas de 96 pozos con fondo en U.*** Se agregaron 50 µl de los glóbulos rojos sensibilizados a las diluciones de los antisueros. Las placas se agitaron y se dejaron incubando a 25C por 1 o 2 h antes de ser leídas. El título fue expresado como la mayor dilución del suero que mostrara un sedimento aplanado, en comparación con el botón de glóbulos rojos en el centro del pozo del testigo negativo. Como testigos se usaron glóbulos rojos no sensibilizados más suero y eritrocitos sensibilizados más diluente.

Se utilizó una técnica de cromatografía en papel para la detección de ácido hialurónico.

Extracto salino. El crecimiento de *P. multocida* en agar extracto de levadura cistina se cosechó en 0.5 ml de solución salina normal a 4C. La mezcla se homogeneizó y se centrifugó a 1500 gravedades durante 30 min para obtener el extracto salino.

Desarrollo de la prueba. Una gota (5-10 µl) del extracto salino se colocó en uno de los extremos de un pedazo de papel para intercambio de iones (Whatman DE 81). Despues de secarse, se sumergió durante 1 h en un recipiente en el que se permitió la entrada de 1 ml/min de una solución 3M de cloruro de sodio, por medio de una microbomba y un catéter de polietileno. El solvente se mezcló con una bala magnética para permitir el flujo del mismo a través del papel. El papel se secó usando una corriente de aire caliente; inmediatamente se tiñó durante 15 min con una solución al 1% de azul de alsacia en ácido acético al 2%. Luego se lavó con agua de la llave para eliminar el exceso de colorante y se le permitió secar a temperatura ambiente. La presencia de una mancha azul al mismo nivel de la mancha originada por el ácido hialurónico purificado se consideró como un resultado positivo, mientras que el no encontrar cambio en el papel se consideró un resultado negativo.

Resultados

Se aislaron 20 cepas de *P. multocida*. Casi todos los aislamientos mostraron colonias mucoides (12 casos), aunque también se encontraron cepas con colonias lisas en 8 casos.

Siete cepas lisas pertenecieron al serotipo capsular D; 12 cultivos de la variedad mucoides y uno con colonias lisas se clasificaron como tipo A por la prueba de hemoaglutinación indirecta (Cuadro 1).

En general, los títulos para todas las cepas fueron más altos en reacciones homólogas comparados con las heterólogas. Estas reacciones cruzadas se consideraron sin significancia.

Todas las cepas usadas en el estudio desarrollaron una mancha azul al mismo nivel que el ácido hialurónico purificado. Los cultivos del serogrupo A mostraron una mancha más clara y grande que los cultivos del serogrupo D (Figuras 1 y 2).

Discusión

Existen 3 variantes de *P. multocida* con base en el aspecto de su colonia: a) Colonias mucoides, grandes y de virulencia moderada para ratones, b) colonias lisas, con tamaño medio y muy virulentas para ratones y c) colonias rugosas o azules, pequeñas y de baja virulencia para ratones.^{1,6}

Se cree que las cepas de *P. multocida* aisladas de pulmones de cerdo son altamente mucoides.^{1,14,15} Datos obtenidos en este estudio concuerdan con dicha afirmación: De 20 cepas el 60% fue mucoides, mientras que 40% perteneció a la variante lisa.

De acuerdo con Carter^{1,2} los serotipos A y D son los más comunes en cerdos. Pijoan *et al.*¹⁵ encontraron que de las cepas aisladas de pulmones de cerdo procedentes

Cuadro 1
GRUPOS CAPSULARES Y DETECCION DE ACIDO
HIALURONICO EN 20 CEPAS DE *Pasteurella multocida*

Cepas	Estructura de colonia	Título con HI		Acido hialurónico
		A	D	
1	mucoides	256	8	+
2	mucoides	512	64	+
3	mucoides	512	64	+
4	mucoides	512	8	+
5	mucoides	512	32	+
6	mucoides	512	8	+
7	mucoides	512	64	+
8	mucoides	512	8	+
9	mucoides	512	16	+
10	mucoides	512	8	+
11	mucoides	512	4	+
12	mucoides	512	16	+
13	lisa	8	512	+
14	lisa	1024	64	+
15	lisa	2	256	+
16	lisa	2	512	+
17	lisa	4	64	+
18	lisa	0	512	+
19	lisa	8	512	+
20	lisa	8	512	+

* Sigma Chemical

** (Donados por Mr. K. Pandit de la Universidad de Surrey, Inglaterra)

*** Nunk, Denmark

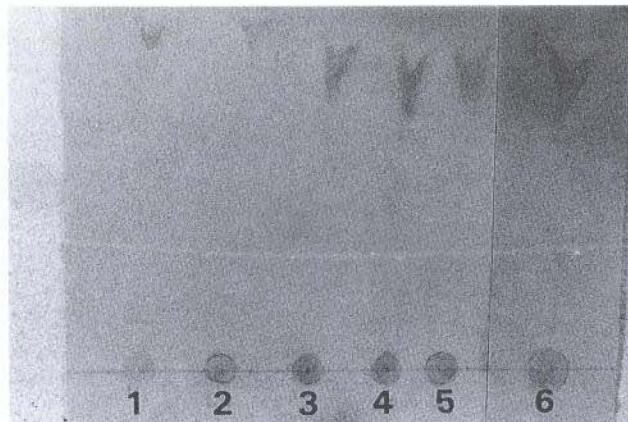


Figura 1. Cromatografía en papel del extracto salino de cepas de *Pasteurella multocida* tipos A y D. 1) Ácido hialurónico purificado, 2) *P. multocida* tipo D, 3, 4, 5 y 6) *P. multocida* tipo A

del rastro 97.3% perteneció al grupo capsular A y 2.7% al D.

Jacques y Foiry⁷ realizaron un estudio de microscopía electrónica para observar el material capsular de *P. multocida* A y D; ellos demostraron que la cápsula de las cepas del serotipo A fue más ancha (70-90nm) y regular, mientras que la cápsula de los aislamientos del grupo D fue más delgada (20-30nm) e irregular.

Los resultados de este trabajo muestran que 65% de las cepas se clasificó como tipo A y, salvo una, todas fueron altamente mucoídes; el 35% perteneció al serotipo D y presentó colonias de la variante lisa. Esto sugiere que los serotipos de *P. multocida* aislados de los cerdos se relacionan estrechamente con el aspecto de la colonia; tal característica podría emplearse como parte de una clasificación preliminar de los futuros aislamientos, ahorrando reactivos y tiempo.

El material capsular de *P. multocida* se compone sobre todo de carbohidratos. En un estudio reciente, Rosner *et al.*¹⁸ comunicaron la presencia de (1 → 4)-B-D-Xilan como parte de la cápsula de *P. multocida* tipo A; sin embargo, el ácido hialurónico es el principal componente de este serotipo, mientras que la naturaleza del tipo capsular D aún no se describe completamente.^{4,10,16,18,21}

Carter¹ encontró que algunas cepas del serotipo D muestran una ligera disminución del tamaño de las colonias cuando se encuentran cerca de la estría de *Staphylococcus aureus* productor de hialuronidasa, indicando que estas cepas pueden tener una pequeña cantidad de ácido hialurónico periférico.

Todas las cepas examinadas se consideraron positivas pues migraron hasta el mismo nivel que el ácido hialurónico purificado. Las cepas del tipo A desarrollaron una mancha más grande que las del serotipo D.

Estos hallazgos sugieren que el material capsular de las cepas del serotipo D pueden contener ácido hialurónico como las del serotipo A, o que pueden tener una substancia diferente que migra al mismo nivel. El tamaño de la mancha desarrollada por las cepas del grupo A está de acuerdo con la presencia de

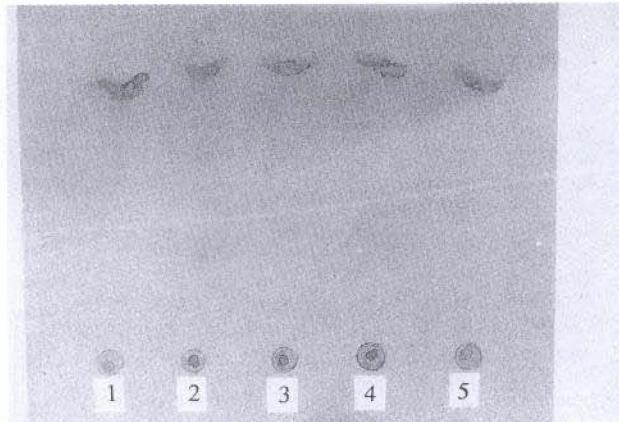


Figura 2. Cromatografía en papel del extracto salino de cepas de *Pasteurella multocida* tipo D. 1) Ácido hialurónico purificado, 2, 3, 4 y 5) *P. multocida* tipo D

una cápsula más grande en comparación con las del tipo D. Se deben instrumentar estudios a futuro para determinar la naturaleza precisa del material capsular del serotipo D.

Abstract

A total of 20 strains of *P. multocida* was isolated from pig lungs. Seven smooth colony strains belonged to serotype D, whereas 12 highly mucoid and one smooth strains were classified as type A by the indirect haemagglutination test. A salt gradient paper chromatography was used for the detection of hyaluronic acid. All *P. multocida* strains tested, developed a blue spot at the same level as the purified hyaluronic acid did. Serotype A strains showed a more distinct and bigger spot than serotype D cultures. Findings suggest that the capsular material of serotype D strains may contain hyaluronic acid as serotype A does, or may have a different substance that migrates to the same level.

Agradecimientos

Se agradece el asesoramiento de Mr. K. Pandit, quien modificó la técnica cromatográfica usada en el presente trabajo.

Literatura citada

1. Carter, G.R.: Serotyping of *Pasteurella multocida*. In: Methods in Microbiology. Vol. 16. Edited by: Bergan, T., Norris, J.R., 247-258. Academic Press, London, 1984.
2. Carter, G.R.: Genus *Pasteurella*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Edited by: Krieg, N.R., Holt, J.G., 552-557. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, 1984.
3. Carter, G.R. and Chengappa, M.M.: Hyaluronidase production by type b *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. *J. Clin. Microbiol.*, 11: 94-96 (1980).
4. Cifonelli, J.A., Rebers, P.A. and Heddleston, K.H.: The isolation and characterization of hyaluronic acid from *Pasteurella multocida*. *Carbohydr. Res.*, 14: 272-276 (1970).

5. Cowart, R.P., Backstrom, L. and Brim, T.A.: *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis and pneumonia in swine. *Can. J. vet. Res.*, 53: 295-300 (1989).
6. Gillespie, J.H. and Timoney, J.F.: *Hagan and Brunner's Infectious Diseases of Domestic Animals*. 7th ed. *Cornell University Press*, London, 1981.
7. Jacques, M. and Foiry, B.: Electron microscopic visualization of capsular material *Pasteurella multocida* types A and D labeled with polyclonal ferritin. *J. Bact.*, 169: 3470-3472 (1987).
8. Kasper, D.L.: Bacterial capsule-old dogmas and new tricks. *J. Infect. Dis.*, 153: 407-415 (1986).
9. Kilian, M., Frederiksen, W. and Biberstein, E.L.: *Haemophilus, Pasteurella* and *Actinobacillus*. *Academic Press*, London, 1981.
10. Kodama, H., Matsumoto, M. and Snow, L.M.: Immunogenicity of capsular antigens of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Am. J. vet. Res.*, 42: 1838-1841 (1981).
11. Letellier, A., Dubrevil, D., Roy, G., Fairbrother, J.M. and Jacques, M.: Determination of affinity of *Pasteurella multocida* isolates from porcine respiratory tract mucus, and partial characterization of the receptors. *Am. J. vet. Res.*, 52: 34-39 (1991).
12. Marineau-Doizé, B., Ménard, J., Girard, C., Frantz, J.C. and Martineau, G.P.: Effects of purified *Pasteurella multocida* dermonecrotic toxin on the nasal ventral turbinates of fattening pigs: Histological observations. *Can. J. vet. Res.*, 55: 377-379 (1991).
13. Pérez-Martínez, J.A., Suárez-Güemes, F. y Flores-Castro, R.: *Bacteriología General Principios Químicos Biológicos*. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.*, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1990.
14. Pijoan, C., Lastra, A., Ramírez, C. and Leman, A.D.: Isolation of toxicogenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of puermonic swine. *J. Am. vet. med. Ass.*, 185: 522-523 (1984).
15. Pijoan, C., Morrison, R.B. and Hilley, H.D.: Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 1074-1076 (1983).
16. Pijoan, C. and Trigo, F.: Bacterial adhesion to mucosal surface with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. *Can. J. vet. Res.*, 54: S16-S21 (1990).
17. Rebers, P.A., Jensen, A.E. and Laird, G.A.: Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis.*, 32: 313-318 (1988).
18. Rosner, H., Grimmcke, H., Knirel, Y.A. and Shashkov, A.S.: Hyaluronic acid and a (1 → 4)-B-D xilan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. *Carbohydr. Res.*, 223: 329-333 (1992).
19. Thurston, J.R., Rimler, R.B., Ackermann, M.R., Cheville, N.F. and Sacks, J.M.: Immunity induced in rats vaccinated with toxoid prepared from heatstable toxin produced by *Pasteurella multocida* serogroup D. *Vet. Microbiol.*, 27: 169-174 (1991).
20. Troy, F.A.: The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. *Ann. Rev. Microbiol.*, 33: 519-560 (1979).
21. Tsuji, M. and Matsumoto, M.: Pathogenesis of fowl cholera: Influence of encapsulation of the fate of *Pasteurella multocida* after intravenous inoculation in turkeys. *Avian Dis.*, 33: 238-247 (1989).
22. Vena, M.M., Blanchard, B., Thomas, D. and Kobisch, M.: Adherence of *Pasteurella multocida* isolated from pigs and relationship with capsular type and dermonecrotic toxin production. *Ann. Rech. Vet.*, 22: 211-218 (1991).