

El uso de cerveza como suplemento alternativo para el crecimiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* factor V dependiente

Susana Patricia Miranda[°]
Gabriela Bárcenas[°]
María Eugenia Rosales[°]
Juan Antonio Montaraz[°]

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina, enfermedad de serias consecuencias para las granjas afectadas por la elevada mortalidad de animales en crecimiento.^{3,10} Hasta la fecha se han descrito 12 serotipos y 2 biotipos, los primeros con base en antígenos capsulares^{3,4,7} y los segundos de acuerdo con su dependencia del factor V para su crecimiento *in vitro*.^{8,9}

Dentro de los factores de virulencia de este microorganismo, se encuentran las hemolisinas, de las cuales se han descrito dos tipos⁵ y se sabe que su producción está en función del medio de cultivo y de la presencia de calcio libre en éste.^{1,6}

Algunos problemas a los que se enfrentan tanto los investigadores como los productores de biológicos, es la obtención del microorganismo o sus productos de excreción en forma abundante, sencilla y económica, en particular debido a los requerimientos de factores de crecimiento entre los que sobresale el factor V, que usualmente se suministra en forma de dinucleótido de nicotinamida (NAD). El objetivo de este trabajo fue probar el uso de cerveza como sustituto del factor V comercial adicionada a un medio tradicional de cultivo, el caldo infusión cerebro corazón (BHI), ya que se conoce que en la producción de cerveza la fermentación se lleva a cabo por levaduras que proveen, entre otras sustancias aromáticas, nucleótidos que pueden funcionar como factor V. Para evaluar el comportamiento del microorganismo en presencia de cerveza se detectó la producción de hemolisinas.

Se utilizaron los siguientes serotipos de *A. pleuropneumoniae*: 1 (ATCC#27088), 3 (ATCC#33378), 5 (ATCC # 33377), 7*, 9**, 11** y 12**. Todas estas cepas mostraron ser factor V dependientes mediante la prueba de satelitismo con *Staphylococcus aureus*.

Para evaluar la utilidad de la cerveza, se realizó una cinética de crecimiento del serotipo 1 comparando caldo BHI complementado con 20% de cerveza*** previamente filtrada y desgasificada (BHI-C) y caldo BHI complementado con 0.01% de NAD**** (BHI-NAD). Para esto se sembró *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 en placas de agar BHI por satelitismo y se incubó a 37°C durante 24 h; con este cultivo se inoculó un matraz de 1 litro con 300 ml de caldo BHI-NAD incubándose en agitación (200 rpm) a 37°C por 18 h. Se usaron 30 ml de este cultivo para inocular matraces de 1 litro, los cuales contenían 300 ml de caldo BHI-NAD o caldo BHI-C y se incubaron en agitación a 37°C por 10 h. A partir de los primeros 60 minutos de cultivo, se tomaron muestras de 3 ml cada hora para establecer pureza (prueba de satelitismo) y concentración del microorganismo. Esta última se estableció mediante espectrofotometría a 590 nm de longitud de onda.

Para la detección de hemolisinas se realizó una cinética similar a la anterior, adicionando o no a ambos medios 10mM CaCl₂. Las muestras obtenidas se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min y 50 µ del sobrenadante se depositaron en un círculo de papel filtro estéril de 1cm de diámetro que a su vez se encontraba en el centro de una caja de agar sangre (3% sangre heparinizada de bovino). La lectura se realizó visualmente y se determinó la presencia o ausencia de halos de hemolisis. Como testigos negativos se emplearon muestras de medio de cultivo.

Para verificar el crecimiento de los serotipos estudiados en medio sólido, se empleó agar BHI complementado con 0.01% NAD o 20% de cerveza.

Los resultados indican que todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* estudiados crecen en agar BHI-C.

La Figura 1 ilustra el crecimiento de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 en BHI-NAD y BHI-C. Los tiempos de generación fueron de 106 min con BHI-NAD y de 86 min con BHI-C; se calcularon a partir de las porciones lineales trazadas, considerando siete puntos de los datos para BHI-NAD y cinco puntos para BHI-C, dando una correlación de 0.98 para ambos casos.

En la Figura 2 se ejemplifica el tipo de halo de hemolisis producido por sobrenadantes de los distintos cultivos empleados. En el Cuadro 1 se señalan los grados de actividad hemolítica presentes en los diferentes medios y a los distintos tiempos durante la cinética de crecimiento. Puede observarse que en el medio BHI-

Recibido para su publicación el 26 de noviembre de 1992

[°] Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Coordinación General de Estudios de Posgrado. Apartado Postal 25. 54700 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

* Proporcionados por el Dr. F. Ross, Universidad Estatal de Iowa, EUA

** Proporcionados por el Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Guelph, Canadá

*** Cerveza Corona

**** Sigma Chemicals, EUA

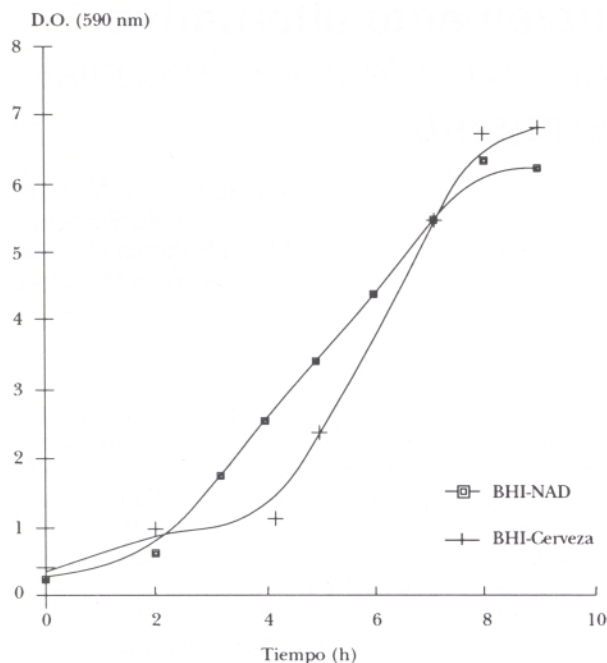


Figura 1. Cinética de crecimiento de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 en BHI-NAD y BHI-cerveza

NAD, la presencia de calcio aumenta la actividad hemolítica, mientras que en el medio BHI-C la presencia de calcio no parece tener el mismo efecto. Por otra parte, la hemólisis observada en ambos medios con calcio durante las primeras 4 h de cultivo es igual; a partir de este momento tiende a ser más pronunciada en BHI-NAD.

Cuadro 1
ACTIVIDAD HEMOLITICA* DE LOS SOBRENADANTES
DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1
CULTIVADO EN DIFERENTES MEDIOS

Tiempo (h)	BHI-NAD		BHI-Cerveza	
	sin calcio	con calcio	sin calcio	con calcio
2	++	+++	+	+++
3	+	++	+	++
4	++	++	+++	++
5	++	+++	++	+
6	++	++	++	++
7	+	++	++	+
8	+	++	++	+
9	++	++	+	++
10	+++	+++	+	+

*La actividad hemolítica se expresa de menos a más con+, ++, +++

En este trabajo se utilizó cerveza como sustituto del factor V en el crecimiento *in vitro* de *A. pleuropneumoniae*. Se probó que todos los serotipos empleados crecen en agar BHI-C. Por otra parte, la cinética de crecimiento del serotipo 1 en caldo BHI-NAD y BHI-C fue similar, observándose que en el caso de BHI-C el microorganismo tiene una fase de adaptación más larga. Sin embargo, la fase de crecimiento logarítmica

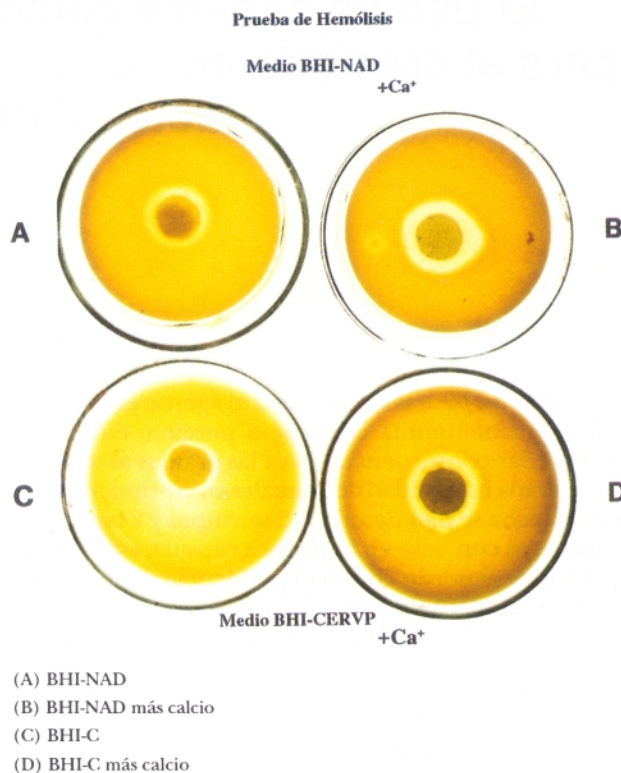


Figura 2. Actividad hemolítica de los sobrenadantes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 crecido en diferentes medios

es más corta, lo cual se refleja en un tiempo de generación más corto. Esto puede deberse a que la cerveza aporta nutrientes adicionales al medio de cultivo.

En cuanto a la producción de hemolisina, ésta se observó en ambos medios y, según lo informado por otros autores,^{1,2} fue más notable en presencia de calcio. No obstante que el método empleado para detectar la hemolisina es cualitativo, se hizo un esfuerzo por estimar el grado de hemólisis observado. Dentro de las limitaciones del caso, se observó una actividad equivalente en BHI-NAD y BHI-C suplementados con calcio durante las primeras 4 h de cultivo; en la segunda mitad de la cinética la actividad hemolítica en BHI-NAD tendió a ser mayor. Empero, los datos permiten asegurar que la presencia de cerveza en el medio de cultivo no impide la síntesis y excreción de estas toxinas.

No existe información precisa en cuanto a los posibles contenidos de la cerveza que pudieran funcionar como factor V. En este sentido, frecuentemente se considera este factor como sinónimo de dinucleótido de nicotinamida (NAD). Sin embargo, estudios recientes tanto con precursores de NAD como con análogos de éste, sugieren que las características que deben tener la molécula que sirva como factor V son: a) compuestos pirimídicos que posean un enlace entre piridina y ribosa en la configuración β y b) un grupo carboxiamido en la piridina en la posición 3. Por lo tanto, el mononucleótido de nicotinamida (NMN), la ribosa nicotinamida (NR), el dinucleótido de

nicotinamida-guanina (NGD), el dinucleótido de nicotinamida-hipoxantina (NHD) y el dinucleótido de dinicotinamida (DND) pueden funcionar como factor V (NAD).⁸ En virtud de lo anterior y de los resultados obtenidos con la cerveza como aditivo en el crecimiento de *A. pleuropneumoniae*, se podría intentar definir el o los compuestos que en ella actúan como factor V, ya que, entre otras cosas podría desarrollarse un método que los cuantificara, pues es factible pensar que el contenido de los mismos podría variar entre diferentes lotes con los consecuentes cambios en biomasa bacteriana y productos de excreción de la misma.

Abstract

The present study tested the use of beer as a substitute for factor V in the *in vitro* growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 12 factor V-dependent. A culture kinetics of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 grown on brain and heart infusion broth, supplemented with either 0.01% nicotine-adenine-dynucleotide (BHI-NAD) or 20% beer (BHI-C), was compared. Generation time was shorter and adaptation phase larger on BHI-C; however, at the end of the culture, equivalent quantities of microorganisms were obtained in both media. During the kinetics, excretion of haemolysin was evaluated in both media, and it was observed that beer did not inhibit synthesis and excretion of this important toxin. It is concluded that beer is an economic and easy to handle alternative for factor V in the culture of *A. pleuropneumoniae*.

Literatura citada

1. Frey, J. and Nicolet, J.: Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca^{2+} . *Infect. Immunol.*, 56: 2570-2575 (1988).
2. Frey, J. and Nicolet, J.: Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 232-236 (1990).
3. Gunnarsson, A., Hurvell, B. and Biberstein, E.L.: Serologic studies of porcine strains of *Haemophilus para-haemolyticus* (*pleuropneumoniae*): Antigenic specificity and relationship between serotypes. *Am. J. vet. Res.*, 33: 1286-1292 (1976).
4. Inzana, T.J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R.P. and Anderson, P.: Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immunol.*, 56: 1880-1889 (1988).
5. Kamp, E.M., Popma, J.K., Anakotta, J. and Smits, M.A.: Identification of the hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immunol.*, 59: 3079-3085 (1991).
6. Maudsley, J.R. and Kadis, S.: Growth and hemolysin production by *Haemophilus pleuropneumoniae* cultivated in a chemical defined medium. *Can. J. Microbiol.*, 32: 801-805 (1986).
7. Moller, K. and Kilian, M.: V factor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2711-2716 (1990).
8. Niven, D.F. and Reilly, T.O.: Significance of V-factor dependency in the taxonomy of *Haemophilus* species and related organism. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 1-4 (1990).
9. Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W. and Mannheim, W.: Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) on the basis of phenotypic and DNA relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 510-514 (1983).
10. Shope, R.E., White, D.C. and Leidy, G.: Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. exp. Med.*, 119: 357-368 (1964).