

Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina

G. A. LEOTTA^{1,3*}, G. B. VIGO³, I. CHINEN¹, M. PRIETO², R. CALLEJO², M. RIVAS¹

¹ Servicio Fisiopatogenia, ² Servicio Bacteriología Especial, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS)

“Dr. Carlos G. Malbrán”. Avda. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires;

³Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, cc: 296 (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: galeotta@anlis.gov.ar

RESUMEN

Treinta cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina a partir de muestras de origen humano y animal fueron identificadas, biotipificadas y caracterizadas. Veintidós de ellas (73%) correspondieron a *P. multocida* subsp. *multocida*; cinco (17%) a *P. multocida* subsp. *gallicida* y tres (10%) a *P. multocida* subsp. *septica*. Todas las cepas fueron agrupadas en 8 biotipos; el 70% presentó el tipo capsular A. Los serotipos somáticos más frecuentes fueron el 1 (n:11) y el 3 (n:9). Las cepas de origen porcino fueron resistentes a tiamulina, estreptomycin y tetraciclina. La caracterización de las cepas de *P. multocida* aisladas en la Argentina es el primer paso para concretar futuros estudios destinados a la prevención y al tratamiento de la pasteurellosis en medicina humana y veterinaria.

Palabras clave: pasteurellosis, *Pasteurella multocida*, biotipificación, concentración inhibitoria mínima, PCR.

ABSTRACT

Identification, biotypification and characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated in Argentina.

Thirty *Pasteurella multocida* strains isolated in Argentina from human and animal samples were identified, biotyped and characterized. Twenty-two (73%) strains were identified as *P. multocida* subsp. *multocida*, 5 (17%) as *P. multocida* subsp. *gallicida*, and 3 (10%) as *P. multocida* subsp. *septica*. All strains were grouped in 8 biotypes, and 70% of the strains presented capsular type A. The most frequent somatic serotypes were 1 (n:11) and 3 (n:9). *P. multocida* strains from swine source were resistant to tiamulin, streptomycin and tetracycline. Characterization of *P. multocida* strains isolated in Argentina is the first step to conduct future studies intended for the prevention and treatment of pasteurellosis in human and veterinary medicine.

Key words: pasteurellosis, *Pasteurella multocida*, biochemical typing, minimum inhibitory concentration, PCR.

La familia *Pasteurellaceae* está constituida por 9 géneros, de los cuales *Pasteurella* es el género tipo. Todos los miembros de este género son microorganismos gram-negativos, aerobios-anaerobios facultativos, no esporulados e inmóviles. Según el Comité Internacional sobre Sistemática de Procariotes (<http://www.the-icsp.org/subcoms/Pasteurellaceae.htm>), la especie tipo del género es *Pasteurella multocida*, caracterizada por producir catalasa, citocromo oxidasa e indol; reducir nitrato; utilizar glucosa, manosa y sacarosa; no crecer en agar MacConkey y no producir hemólisis ni ureasa (8). *P. multocida* se divide en tres subespecies según su capacidad de utilizar trehalosa, dulcitol y sorbitol: *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica* y *P. multocida* subsp. *gallicida* (8). Los esquemas de tipificación utilizados con mayor frecuencia para *P. multocida* incluyen 5 tipos capsulares (A, B, D, E, F) y 16 serotipos somáticos (1-16) (2, 5).

La pasteurellosis es considerada una enfermedad zoonótica, cuyo principal reservorio se encuentra en los

animales domésticos y silvestres (7). Los animales domésticos padecen diferentes presentaciones de pasteurellosis: cólera aviar, neumonía porcina, septicemia hemorrágica bovina. También se describen infecciones que afectan a conejos, cabras y ovejas (1). Estas enfermedades tienen un gran impacto económico, principalmente en los animales de cría intensiva como cerdos y aves. Las infecciones más frecuentes en el hombre están asociadas con mordeduras o arañazos de perros y gatos (6, 8). En la Argentina, el primer aislamiento de *Pasteurella* se realizó en 1939 (13), el primer caso de pasteurellosis humana se describió en 1950, y en la década de 1970 se reconoció a *P. multocida* como agente etiológico de pasteurellosis en aves, porcinos, conejos y bovinos (3). El principal método para el control de las enfermedades causadas por *P. multocida* en animales de cría intensiva es un adecuado manejo sanitario. Sin embargo, en los criaderos de cerdos se utilizan antibióticos como terapia preventiva, y en la industria avícola

la se usan vacunas muertas para prevenir el cólera aviar. Hasta el presente, en la Argentina no se han realizado estudios sobre la resistencia de *P. multocida* a los antimicrobianos de uso masivo en animales domésticos, y no se conoce si el criterio de selección de las cepas vacunales se fundamenta en estudios epidemiológicos. El objetivo del presente trabajo fue identificar, biotipificar y caracterizar 30 cepas de *P. multocida* aisladas en la Argentina a partir de muestras de origen humano y animal con diagnóstico definitivo de pasteurelisis.

Se estudiaron 10 cepas de *P. multocida* aisladas de cerdos con neumonía, 9 cepas de gallinas reproductoras con cólera aviar crónico, 3 cepas de aves antárticas con cólera aviar, y 8 cepas de origen humano (Tabla 1). Se incluyeron 3 cepas de referencia como controles positivos: *P. multocida* subsp. *multocida* NADC P-1059, *P. multocida* subsp. *septica* NADC P-1591 y *P. multocida* subsp. *gallicida* ATCC 51689. Todas las cepas fueron identificadas por el micrométodo comercial API20E (BioMérieux, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y por sus características tintoriales, morfológicas y bioquímicas (4, 8).

Se realizaron las siguientes determinaciones: hemólisis en medio agar base sangre (Difco Laboratories, Le Pont de Claix, France) adicionado con 5% de sangre de carnero, catalasa (Difco), citocromo oxidasa (Laboratorio Britania, Bs. As., Argentina), crecimiento en agar MacConkey (Difco), reducción de nitrato (Difco), producción de indol en agar sulfuro indol movilidad (Difco), descarboxilación de ornitina (Difco) y producción de ureasa (Difco). Cada aislamiento fue inoculado en caldo base rojo de fenol (Difco), al que se le adicionaron los siguientes carbohidratos al 1%: glucosa, manosa, arabinosa, dulcitol, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, trehalosa, sorbitol y xilosa (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, EE.UU.). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La tipificación capsular se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico USGS (Wisconsin, EE.UU.) utilizando la técnica de PCR múltiple, descrita por Townsend *et al.* (14). La serotipificación somática se realizó mediante la técnica de inmunodifusión, acorde con la metodología descrita por Heddleston *et al.* (5), empleando antiseros provistos por el National Veterinary Services Laboratory (Ames, Iowa, EE.UU.).

Se evaluó la sensibilidad de las cepas a los siguientes antimicrobianos: aivlosin (Vetanco S.A., Vicente López, Bs. As., Argentina), ampicilina (ICN), cefalotina (ICN), ceftiofur (Vetanco), enrofloxacin (Vetanco), estreptomycin (Wako Pure Chemical Ltd., Osaka, Japón), florfenicol (Vetanco), gentamicina (ICN), tetraciclina (ICN), tiamulina (Laboratorios Aviar, Bs. As., Argentina), y tilosina (Laboratorios Aviar). La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó mediante la técnica de microdilución (11). Cada cepa se evaluó por duplicado. La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta los valores definidos para *P. multocida* (10, 11), a excepción de gentamicina (otras bacterias no-*Enterobacteriaceae*),

ampicilina, tetraciclina (*Enterobacteriaceae*), tiamulina (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) y estreptomycin (*E. coli*) (12). Hasta el presente, los valores de corte para los macrólidos aivlosin y tilosina no se encuentran estandarizados.

Las cepas aisladas de aves antárticas y de gallinas reproductoras presentaron en agar sangre colonias pequeñas, de 2-3 mm de diámetro, opacas y adherentes al medio, mientras que las cepas aisladas de cerdos y humanos presentaron colonias mucosas y confluentes. Al microscopio óptico todas las cepas mostraron morfología de bacilos cortos gram-negativos, con coloración bipolar. Las 30 cepas aisladas en la Argentina y las 3 cepas de referencia fueron identificadas como *P. multocida*. Entre las cepas estudiadas se identificaron las 3 subespecies de *P. multocida* (Tabla 1). Veintidós cepas (73%) fueron identificadas como *P. multocida* subsp. *multocida*, cinco (17%) como *P. multocida* subsp. *gallicida*, y tres (10%) como *P. multocida* subsp. *septica*.

Si bien Mutters *et al.* (9) sugirieron que la capacidad de descarboxilar ornitina es útil para diferenciar las especies del género *Pasteurella*, Fegan *et al.* consideraron que el valor de esta prueba es limitado (4). Las cepas aisladas de aves antárticas fueron ornitina descarboxilasa negativas e identificadas como *P. multocida* subsp. *gallicida*. Sólo una cepa aislada de cerdo fue indol negativa, esto coincide con lo informado por Holmes *et al.* (6), quienes demostraron que el 80-89% de las especies del género *Pasteurella* son indol positivas. Fegan *et al.* (4) y Koneman *et al.* (8) describieron que *P. multocida* subsp. *gallicida* se caracteriza por producir ácido a partir de xilosa; sin embargo, 4 cepas de *P. multocida* subsp. *gallicida* aisladas en la Argentina y la cepa ATCC 51689 no utilizaron este hidrato de carbono. Según Koneman *et al.* (8), no todas las cepas de *P. multocida* subsp. *gallicida* producen ácido a partir de arabinosa; nosotros identificamos una cepa de *P. multocida* subsp. *gallicida* aislada de gallina arabinosa negativa. Por lo tanto, consideramos que la utilización de xilosa y arabinosa puede ser variable en la subespecie *gallicida*. En el presente trabajo se identificaron 2 cepas de *P. multocida* subsp. *multocida* de origen humano que utilizaron lactosa. Si bien *P. multocida* no se caracteriza por producir ácido a partir de lactosa, en raras ocasiones se pueden encontrar cepas lactosa positivas (8).

Considerando las particularidades fenotípicas mencionadas, las 30 cepas aisladas en la Argentina fueron agrupadas en 8 biotipos (Tabla 2). Entre estos biotipos se incluyeron las cepas de referencia NADC P-1059 y NADC P-1591. Sin embargo, la cepa de *P. multocida* subsp. *gallicida* ATCC 51689 presentó un perfil bioquímico diferente del de las cepas de *P. multocida* subsp. *gallicida* autóctonas.

Veintidós cepas (70%) presentaron el tipo capsular A, (8 cepas aisladas de gallinas reproductoras, 6 cepas aisladas de humanos, 5 cepas aisladas de cerdos y 3 cepas

Tabla 1. Origen, enfermedad, lugar y año de aislamiento, y caracterización fenotípica de 30 cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de aves, cerdos y humanos en Argentina y de 3 cepas de referencia.

Cepa	Origen	Enfermedad	Lugar de aislamiento	Año de aislamiento	subespecie	biotipo	Tipo capsular	Serotipo somático	Sensibilidad a antibióticos
A 1	Petrel gigante	Cólera aviar	Antártida	2000	<i>gallicida</i>	8	A	1	S
A 2	Skua	Cólera aviar	Antártida	2001	<i>gallicida</i>	8	A	1	S
A 3	Pingüino Adelia	Cólera aviar	Antártida	2001	<i>gallicida</i>	8	A	1	S
C 1	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2000	<i>multocida</i>	3	D	3x5	Tia
C 2	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2000	<i>multocida</i>	3	A	3	Str / Tia
C 3	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2000	<i>multocida</i>	3	A	3	Str /Tia
C 4	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2002	<i>multocida</i>	3	D	w3	Tia
C 5	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	(D)	<i>multocida</i>	3	D	3x5	Str / Tia
C 6	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2000	<i>multocida</i>	3	A	3	Str / Tia
C 7	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2002	<i>multocida</i>	3	D	3x5	Tet / Tia
C 8	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2002	<i>multocida</i>	1	A	w4	S
C 9	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2000	<i>multocida</i>	3	D	3x5	Str / Tia
C 10	Cerdo	Neumonía	Buenos Aires	2002	<i>multocida</i>	3	A	3	Str / Tia
G 1	Gallina	Cólera aviar	Buenos Aires	2000	<i>gallicida</i>	7	A	1	S
G 2	Gallina	Cólera aviar	Buenos Aires	(D)	<i>multocida</i>	3	A	3	S
G 4	Gallina	Cólera aviar	Buenos Aires	1998	<i>multocida</i>	3	A	NT	S
G 5	Gallina	Cólera aviar	Buenos Aires	1999	<i>multocida</i>	3	A	12	S
G 6	Gallina	Cólera aviar	Santa Fe	1995	<i>multocida</i>	3	NT	2x5	S
G 9	Gallina	Cólera aviar	Entre Ríos	1998	<i>multocida</i>	3	A	3	S
G 10	Gallina	Cólera aviar	Buenos Aires	1997	<i>multocida</i>	3	A	3	S
G 11	Gallina	Cólera aviar	Buenos Aires	1983	<i>gallicida</i>	6	A	1	S
G 13	Gallina	Cólera aviar	Buenos Aires	1985	<i>septica</i>	5	A	1	S
H 1	Humano	(D)	Buenos Aires	1995	<i>septica</i>	5	NT	NT	S
H 2	Humano	Herida	Buenos Aires	1994	<i>multocida</i>	2	A	1	S
H 3	Humano	Herida	Buenos Aires	1996	<i>multocida</i>	4	A	1	S
H 5	Humano	Neumonía	Río Negro	2000	<i>multocida</i>	2	A	1	S
H 6	Humano	Herida	San Juan	2001	<i>multocida</i>	2	A	1	S
H 7	Humano	Herida	Córdoba	2000	<i>multocida</i>	2	A	3	S
H 8	Humano	Abscesos de tórax	Buenos Aires	2001	<i>multocida</i>	4	A	1	S
H 9	Humano	Bacteriemia	Buenos Aires	2000	<i>septica</i>	5	NT	NT	S
NADC P-1059	Pavo	(D)	(D)	(D)	<i>multocida</i>	3	A	3	S
NADC P-1591	Humano	(D)	(D)	(D)	<i>septica</i>	5	A	13	S
ATCC 51689	Bovino	(D)	(D)	(D)	<i>gallicida</i>	NT	A	1	S

NADC: National Animal Disease Center. ATCC: American Type Culture Collection. NT: no tipificable. S: sensible a ampicilina, cefalotina, ceftiofur, enrofloxacin, estreptomycin, florfenicol, gentamicina, tetraciclina, y tiamulina. Tia: resistente a tiamulina, Str: resistente a estreptomycin, Tet: resistente a tetraciclina. (D): desconocido.

aisladas de aves antárticas). Cinco cepas aisladas de cerdos presentaron el tipo capsular D. Es interesante mencionar que si bien el tipo capsular D se asocia a rinitis atrófica porcina, las cepas analizadas fueron aisladas de pulmones de cerdos que no presentaban lesiones en la cavidad nasal. El serotipo somático 1 fue identificado con

mayor frecuencia en las cepas de origen aviar y humano (n:11), y el serotipo 3 fue más frecuente entre las cepas de origen porcino (n:9).

Todas las cepas aisladas de humanos, de aves antárticas y de gallinas reproductoras fueron sensibles a ampicilina, cefalotina, ceftiofur, enrofloxacin, estrepto-

Tabla 2. Biotipos de 30 cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de aves, cerdos y humanos en Argentina y de 3 cepas de referencia.

Características bioquímicas	Biotipos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ornitina descarboxilasa	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Producción de indol	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación:									
Arabinosa	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Xilosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Lactosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Subespecie	<i>m</i> ^a	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>s</i> ^b	<i>g</i> ^c	<i>g</i>	<i>g</i>	<i>g</i>
N = 33	1	4	16	2	4	1	1	3	1

^a *P. multocida* subsp. *multocida*, ^b *P. multocida* subsp. *septica*, ^c *P. multocida* subsp. *gallicida*

micina, florfenicol, gentamicina, tetraciclina y tiamulina. Los valores de CIM obtenidos con aivlosin estuvieron entre 64 y 256 µg/ml, y aquellos obtenidos con tilosina entre 16 y 64 µg/ml. Con las cepas de origen porcino se obtuvieron los valores más altos al realizar la CIM en microdilución con ambos macrólidos. Nueve cepas aisladas de cerdos presentaron resistencia a un antibiótico por lo menos; seis cepas fueron resistentes a tiamulina (32 µg/ml) y a estreptomycin (3 128 µg/ml), dos fueron resistentes a tiamulina (32 µg/ml), y una cepa fue resistente a tiamulina (32 µg/ml) y a tetraciclina (32 µg/ml) (Tabla 1). Esta resistencia podría adjudicarse a la utilización indiscriminada de antibióticos como terapia preventiva en las pjaras.

Consideramos que el conocimiento de las características fenotípicas de cepas de *P. multocida* aisladas en la Argentina es un paso importante para la prevención y el tratamiento de la pasteurelisis en medicina humana y veterinaria, y que es necesario analizar un mayor número de cepas en el marco de estudios epidemiológicos.

Agradecimientos: al Dr. M. J. Wolcott (USGS-National Wildlife Health Center, Madison, Wisconsin, EE.UU.) por colaborar en la serotipificación de las cepas y por proveer las cepas de referencia. A la Dra. N. Leardini, al Dr. J. C. Perfumo y a la Méd. Vet. F. Moredo por su colaboración en el tema.

BIBLIOGRAFIA

1. Biberstein EL. *Pasteurella*. En: Biberstein EL, Zee YC, editores. Review of Veterinary Microbiology. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1990, p. 175-80.
2. Brogden KA, Packer RA. Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. Am J Vet Res 1979; 40: 1332-5.
3. De Diego AI. Guía para el estudio de las enfermedades infecciosas de los animales (aves y mamíferos). Buenos Aires, Argentina. Talleres Gráficos Farro, 1974, p. 752.
4. Fegan N, Blackall PJ, Pahoff JL. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. Vet Microbiol 1995; 47: 281-6.
5. Heddeleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. Fowl cholera; gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis 1972; 16: 925-36.
6. Holmes B, Pickett MJ, Hollis DG. Unusual gram-negative bacteria, including *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Pasteurella*, and *Streptobacillus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editores. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., ASM Press, 1995, p. 632-7.
7. Kehrenberg C, Salmon SA, Watts JL, Schwarz S. Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergenic spread of the *tet(H)* plasmid pMHT1. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 631-40.
8. Koneman EW, Stephen DA, Williams MJ, Schrenberger PC, Washington CW. Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1999, p. 388-461.
9. Mutters R, Ihm P, Pohl S, Fredericksen W, Mannheim W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. Int J Syst Bacteriol 1985; 35: 309-22.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard, 2nd edition, 2002; M 31-A2. Wayne, Pa, USA.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

- Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard, 6th edition, 2003; M 7-A6. Wayne, Pa, USA.
12. NORM-VET 2002. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway, 2003; Tromso, Oslo, Norway.
 13. Savino E, Morales Villazon N, Anchezar B. Presencia de *Pasteurella* sp. Incert. En ratas grises. Revista del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene 1939; 2: 146-8.
 14. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap loci* and development of a multiplex capsular PCR typing system. J Clin Microbiol 2001; 39: 924-9.

Recibido: 10/4/06 – Aceptado: 31/7/06