



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS CAPSULAS DE  
*Pasteurella multocida* tipos A y D EN CEPAS DE REFERENCIA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
**(ÁREA DE MICROBIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A :**  
**VIRGINIA BENITEZ SOLIS**

DIRECTORES DE TESIS:  
DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. RENE MIRANDA RUVALCABA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

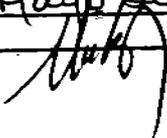
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Virginia Benitez  
Solis

FECHA: 27 Mayo 2005

FIRMA: 

## DEDICATORIAS

*...Doy gracias a Dios por permitirme concluir una meta más en mi camino  
y darme la fuerza día a día para seguir adelante  
...Amén.*

*....A mis padres Ma. Luisa y Jaime quienes han sido el cimiento de mi vida  
y todo cuanto he logrado se lo debo al ejemplo que siempre recibí;  
para lograr mi formación personal, profesional y moral  
.....gracias papás =)*

*....A mis tesoros y enorme regalo de Dios: Mis hijos:  
Karen Marilù y Hugo Jonathan;  
esperando que vean que todo cuanto se quiere, se puede lograr...  
.....los amo chiquitos =)*

*....A mis hermanos José Luis, Moni, Zaira, Jaime y Erika  
....un esfuerzo más de su hermana que tanto los quiere,  
gracias por su comprensión y cariño =)*

.....A mi mejor y gran ejemplo profesional, académico y personal; quién me ha enseñado a hablar y a callar en su debido momento; y me muestra la superación diaria y la excelencia en todo cuanto se realice; a quien le debo este paso tan importante en mi vida, aunado a todas las enseñanzas en química orgánica que me tocó la suerte de aprender con él como mi profesor y ahora compañero de sección; quién me ha mostrado que la amistad y el cariño rebasan la edad, la posición y cualquier otra cosa, de quién siempre he recibido apoyo, cariño y mucha paciencia, de la persona que más admiro y respeto en la FESC....

Mil Gracias: Dr. René Miranda =)

...A la amiga incondicional, la mujercita que jamás da un "no" y trata de mil maneras de ayudar a todo quién se lo solicita, la persona que tiene una trayectoria increíble, además de una superación admirable; por tu gran ejemplo, cariño y amistad, Dios te bendiga.....

.....te quiero mucho Dra. Susana Mendoza.

.....A todos y cada uno de mis compañeros académicos y administrativos,

...A todos los que me saludan cada día

...gracias =)

.....A ustedes Concepción Gomez, Martha Beatriz Vilchis y

Roberto Osnaya

quienes me brindan su ayuda incondicional

y su amistad, gracias =)

...Gabino, por tu apoyo y ayuda en todo momento ...gracias =)

...A mi amiga Minerva Romero Cabiliaes, quien me ayudó enormemente en la elaboración de mis tesis, gracias, te quiero mucho =)

....Para todos mis amigos, mis alumnos queridos que me dan todo su cariño y que me toman como ejemplo de vida personal y profesional, espero que pronto logren todas sus metas también; quiero dedicarles mi trabajo ya que me dan la fuerza necesaria para salir adelante en cada momento a pesar de las adversidades de la vida misma, gracias por considerarme: su amiga =)

Generaciones Q.F.B. desde la 16.... plus 29.....hasta la 31

..."LOS QUIERO DE VERDAD".....gracias por su amistad y su cariño =)

*To Bicho....."Here, there and everywhere",  
I love you.....Thank's a lot. =)*

*" Hay hombres que luchan un día y son buenos; hay otros que luchan un año y son mejores; hay quienes luchan muchos años y son muy buenos; pero hay los que luchan toda su vida , esos son los imprescindibles"  
.....Berton Blesh.*

*Hacia el porvenir.....*

*"...por mas que quise bendecirme y mas purificarme yo era carne no era yo, lo que con amor hacia una mano lo rompía con otra el desamor; yo no creo que haya sido en vano, pero pudo ser mucho mejor; , hacia el porvenir partieron sombras cuando no alcance solo podré alertar si alguien me oye ahí no se olvide pues de iluminar"  
.....Silvio Rodríguez*

*A todos los que han formado mi trayectoria, mis días , mi pasado y mi presente; Mil  
Gracias.....todo mi amor =)      La Vickyta\**

## INDICE

Resumen	
1.0 INTRODUCCION	1
1.1 COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO	1
1.2 PASTEURELOSIS	1
1.2.1 CARACTERISTICAS de <i>Pasteurella multocida</i>	2
1.2.2 EPIDEMIOLOGIA	3
1.2.3 PATOGENIA Y MARCADORES DE VIRULENCIA	5
1.2.4 INMUNOPROFILAXIS	8
1.2.5 QUIMIOTERAPIA	10
1.3 JUSTIFICACION	12
1.4 HIPOTESIS	13
2.0 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GENERAL	14
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	14
3.0 MATERIALES Y METODO	15
3.1 CEPAS DE REFERENCIA	14
3.2 IDENTIFICACION DE <i>Pasteurella multocida</i>	14
3.3. TIPIFICACION DE LA CAPSULA	15
3.3.1 PURIFICACION DE LA CAPSULA	16
3.4 DETERMINACIONES EFECTUADAS	17
3.4.1 CARBOHIDRATOS	19
3.4.2 PROTEINAS	20
3.4.3 LIPIDOS	20
3.5 CROMATOGRAFIA	21
3.6 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	21
3.7 ESPECTROFOTOMETRIA DEL IR	21
3.8 ESPECTROSCOPIA DE RMN <sup>1</sup> H Y RMN <sup>13</sup> C	21
3.9 HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO CAPSULAR	23
4.0 RESULTADOS	24
5.0 DISCUSION	30
6.0 CONCLUSIONES	34
*	
7.0 REFERENCIAS	51
* APENDICE DE ESPECTROSCOPIA	36

Figura 1. Procesos patológicos según la especie animal infectada con <i>Pasteurella multocida</i>	4
Figura 2.- Pruebas bioquímicas primarias y secundarias para <i>Pasteurella multocida</i>	15
Figura 3.- Metodología para extracción de la cápsula: diagrama de flujo	17
Figura 4.- Patrón para Determinación carbohidratos	19
Figura 5.- Patrón para determinación de proteínas	20
Figura 6.- Identificación de <i>P. multocida</i>	24
Figura 7.-Metodología de la extracción capsular	17-19
Figura 8.-Resultados obtenidos en las determinaciones de carbohidratos, lípidos y proteínas	25
Figura 9.-Pruebas de solubilidad	22
Figura 10.-Ácido hialurónico	23
Figura 11.-Espectro 1 de IR	27
Figura 12.-Espectro 2 RMN <sup>1</sup> H	28
Figura 13.-Espectro 3 RMN <sup>13</sup> C	28
Figura 14.-Espectro 4 RMN <sup>1</sup> H	29

## INDICE DEL APENDICE

Figura 1 A.-Espectro electromagnético	37
Figura 2 A.- Descripción de una onda	37
Figura 3 A.- Opciones de vibración en enlaces covalentes	38
Figura 4 A.- Modelo de dos átomos unidos mediante un resorte	38
Figura 5 A.- Espectro de IR para el benzaldehído	39
Figura 6 A.- Regiones del espectro de infrarrojo	40
Figura 7 A.- Diagrama de una espectrómetro de RMN	44
Figura 8 A.- Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la perezona, determinado a 300 MHz (CDCl <sub>3</sub> /TMS).*	44
Figura 9 A.- Flecha vectorial que representa el momento magnético vectorial	45
Figura 10 A.- Campo magnético aplicado a protones	45
Figura 11 A.- Representación esquemática del fenómeno de RMN	46
Figura 12 A.- Notación grafica de fenómenos de protección y desprotección de núcleos de hidrógenos	46
Figura 13 A.- Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la perezona, determinado a 75.5 MHz (CDCl <sub>3</sub> /TMS).	47
Figura 14 A.- Desplazamientos químicos para diferentes tipos de protones	48
Figura 15 A.- Desplazamientos químicos de <sup>13</sup> C para algunos grupos funcionales comunes	48
Figura 16 A.- Desplazamientos químicos del metilo	49
Figura 17 A.- Señales de carbonos	
Ecuación E1 A.- Energía de un fotón o cuanto (Joules)	37
Ecuación E2 A.- Deslazamiento químico en ppm	48
Tabla T1 A.- Absorciones características en el infrarrojo de algunos grupos funcionales	41
Tabla T2 A.- Intensidades de picos relativas para multiplicidades simétricas	50

## Resumen

La *Pasteurella multocida* es comúnmente aislada del tracto respiratorio del cerdo. Ha sido reconocida como el agente etiológico del complejo de la neumonía crónica porcina, complicando la neumonía iniciada por *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

*P. multocida* y *Bordetella bronchiseptica* son considerados los agentes causales de la rinitis atrófica porcina, demostrándose que serogrupos A y D de los cinco serogrupos capsulares de *P. multocida* están implicados en esta enfermedad.

El propósito de este estudio fue caracterizar las estructuras químicas de los polisacáridos capsulares de *Pasteurella multocida* tipos A y D de cepas de referencia tratando de encontrar una posible relación con la patogenicidad, utilizando métodos químicos como Espectrofotometría del infrarrojo y Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Cuando una molécula absorbe radiación IR, la vibración molecular aumenta en intensidad; por lo que cada frecuencia de luz absorbida por una molécula corresponde a una vibración de un enlace específico (grupo funcional). El espectro de IR consiste de bandas; suele ser una grafica de radiación transmitida & longitud de onda. La mayoría de los grupos funcionales provocan absorciones características en el IR que cambian poco de un compuesto a otro. Absorciones características nos dan una información valiosa sobre las estructuras de los compuestos. La cromatografía de partición en cromatoplacas de celulosa permitió confirmar la presencia del ácido hialurónico solamente en el extracto capsular tipo A. Los resultados mostraron por medio de la RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C la presencia del ácido D-galacturónico y el ácido D- glucurónico como productos de la hidrólisis ácida del extracto capsular tipo D.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO

Las enfermedades vírales son importantes en las infecciones secundarias bacterianas, sobretudo en las involucradas con el aparato respiratorio; tales afecciones están bien documentadas tanto en el hombre como en los animales domésticos. La idea de que pudiera existir una cooperación entre virus y bacterias en las neumonías fue conceptualizada a raíz de las pandemias de influenza humana, ocurridas durante el siglo pasado. Aún hoy en día, la neumonía por agentes bacterianos secundarios es una de las complicaciones en los procesos neumónicos del cerdo.

El problema respiratorio porcino, se le conoce como el Complejo Respiratorio Porcino (CRP), y se le considera así, por la gran variedad de agentes infecciosos que se involucran en el proceso neumónico. Sin embargo, existen una serie de trabajos clásicos, realizados por nuestro grupo que han demostrado la participación de virus con virus, de virus con bacterias, de micoplasmas con bacterias y de bacterias con bacterias, en donde actúan en forma sinérgica o interactúan en ellos. De igual manera sabemos que existen agentes patógenos primarios (agentes colonizadores tempranos) y secundarios u oportunistas (agentes colonizadores tardíos), de reciente aparición, por los sistemas de producción porcina (cerdos en explotaciones de alta salud en varios sitios) que han complicado el problema neumónico aparentemente resuelto (en cerdos de explotaciones convencionales), de ahí la necesidad de seguir trabajando en las interacciones o sinergias entre diversos agentes infecciosos (Amass, 1998; Ciprián, 1999).

## 1.2 PASTEURELOSIS

Este proceso puede definirse como la infección, clínica o subclínica, de cualquier sistema órgano o tejido, del que pueden aislarse microorganismos del género *Pasteurella*.

*Pasteurella spp.* se encuadra dentro de la familia *Pasteurellaceae*, un grupo complejo de microorganismos, altamente adaptados a la vida parasitaria y que incluye, además, los géneros *Actinobacillus* y *Haemophilus* (Bisgaard, 1995).

De las seis especies reconocidas dentro del género (Carter 1984), *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* son probablemente las que tienen un papel más destacado como patógenos en los animales de producción y de compañía (Shewen 1986; Biberstein *et al.*, 1991).

A diferencia de lo que ocurre con la Pasteurelisis producida por *P. haemolytica*, que se da fundamentalmente en rumiantes, la Pasteurelisis por *P. multocida* puede afectar a una gran variedad de especies animales y manifestarse de muy diferentes maneras: desde la infección asintomática en conejos hasta cuadros septicémicos en rumiantes o aves, pasando por la infección de vías respiratorias en prácticamente todos los animales de producción (Alwis, 1995).

En el humano se han descrito casos esporádicos de Pasteurelisis por *P. multocida* originados generalmente por arañazos o mordeduras de animales (Dibb and Digranes, 1981; Holst *et al.*, 1992), aunque también pueden darse la contaminación por vía aérea (Klein and Cunha, 1997; Wine *et al.*, 1997)

### 1.2.1 CARACTERÍSTICAS DE *P. multocida*

*P. multocida* es una bacteria Gram-negativa, de forma cocobacilar de 0.5 x 1 µm y tinción claramente bipolar. Muchas cepas presentan cápsula en los cultivos frescos, que rápidamente se pierde tras unos pocos pases de cultivo *in vitro*. No presenta esporas ni flagelos y es una bacteria capaz de fermentar y oxidar ciertos azúcares (Carter, 1984).

Pese a que resultan muy difíciles de demostrar, (Glorioso *et al.* 1982 y Rebers *et al.* 1988) han comprobado la presencia de fimbrias en algunas cepas de *P. multocida*.

La mayoría de cepas de *P. multocida* se caracterizan además por ser catalasa, oxidasa e indol positivas, así como por ser fermentadoras de la sacarosa y el manitol (Heddleston, 1976). Aunque generalmente está catalogada como fermentadora de la glucosa, la mayor parte de las cepas aisladas de conejo utilizan la glucosa únicamente de forma oxidativa (Badiola-Sáiz *et al.*, 1992)

Para su crecimiento requiere la presencia de ciertos aminoácidos y vitaminas , a diferencia de otros géneros de la familia *Pasteurellaceae*, no es NAD dependiente (Jablonski *et al.*, 1996).

Para el primo-aislamiento, es aconsejable el cultivo en medios que contengan sangre. En estos medios, algunas cepas son capaces de producir una decoloración del medio, en las inmediaciones de las colonias, que no debe considerarse como verdadera hemólisis. Crece bien en medios ricos, como TSA o BHI y a diferencia *P. haemolytica*, no es capaz de crecer en medios selectivos como el Agar Mac Conkey o el ASS (Unchitti *et al.*, 1992).

### 1.2.2 EPIDEMIOLOGÍA

La Pasteurelosis es una enfermedad bacteriana infectocontagiosa que puede ser transmitida de un animal infectado a uno no infectado y de un animal infectado a otro previamente infectado.

Esta bien establecido que cuando menor es la distancia entre animales, mayor es la probabilidad de contagio y, aunque la transmisión aérea está generalmente reconocida, ésta sólo parece ser efectiva entre animales próximos. En condiciones experimentales, (Lelkes y Corbett, 1983) comprobaron que por contacto directo la mayoría de los animales se infectan entre la primera y la tercera semana; que a distancias mínimas - jaulas próximas- la mayoría de animales se infectan entre la segunda y la cuarta semana, y a distancias mayores -tres metros-, no se producen infecciones horizontales en al menos 12 semanas.

Aunque la transmisión directa es la más ampliamente reconocida, también parecen existir otras formas de transmisión. (Colmes *et al.* 1983) involucran a los bebederos contaminados como posible vía de infección cruzada y (Shewen, 1986) a insectos.

Huésped	Proceso patológico	Serotipos más frecuentes	Características destacadas
Bovinos	Septicemia hemorrágica	B:2, E:2, B:3, 4	Altas tasas de mortalidad
	Neumonía	A:3, A:3,4	Generalmente asociada a <i>M. haemolytica</i>
Ovinos	Neumonía	D:1, D:4	Consolidación pulmonar
Pollos	Cólera aviar	A:1, A:3, B:4, A:5, A:8	Altas tasas de mortalidad
Pavos	Cólera	A:9	Depresión, inapetencia y diarrea
Cerdos	Rinitis atrófica	A:3, D:3	Involucrada una toxina demonecrótica
	Neumonía	A:3.5, D:4, D:10	Frecuentemente asociada a <i>Mycoplasma spp.</i>
Conejos	Coriza	A:12	Lagrimeo y secreción nasal
	Neumonía	A:3, A:12	Consolidación pulmonar

FIGURA 1.- PROCESOS PATOLÓGICOS SEGÚN LA ESPECIE ANIMAL INFECTADA CON *Pasteurella multocida*.

En el caso del conejo, la colonización de vías respiratorias superiores puede encontrarse a niveles de prevalencia tan altos como del 75-90% (Holmes *et al.*, 1983; DiGiacomo *et al.*, 1983), con un 30-45% de animales con signos clínicos (DiGiacomo *et al.*, 1983). En un estudio a nivel de matadero, se detectó otitis media en un 4% de los animales jóvenes y en un 32% de los animales adultos (Flatt *et al.*, 1977). La prevalencia de lesiones neumónicas macroscópicas, en animales aparentemente sanos de 8-10 semanas de vida, puede llegar a alcanzar niveles del 20% (Flatt and Dungworth, 1971).

Aunque se han tratado de asociar como marcadores de virulencia, el papel de los antígenos somáticos y capsulares parece centrarse principalmente en su vertiente epidemiológica. Los métodos de clasificación más utilizados son (i) el de (Heddleston *et al.*, 1972), ampliado por (Brogden *et al.*, 1978), centrado en la composición del lipopolisacárido y en el que se contemplan 16 serotipos diferentes; y (ii) el de (Carter, 1955) con el que, atendiendo a la composición capsular, se han descrito cuatro serotipos diferentes. Años más tarde se adicionó un quinto tipo capsular (Rimler and Rhoades, 1987).

En los conejos los serotipos dominantes son el 3 y el 12 de la clasificación de Heddleston y el A y D de la clasificación de Carter, con algunas diferencias entre países. Así, en España el serotipo dominante es el A:3 (Badiola-Sáiz *et al.*, 1992) en Francia el serotipo más frecuente es el A:12 (Morisse, 1979); en Bélgica dominan el A:3 y el A:12 (Spanoghe, 1984; Okerman, 1994) en Canadá el serotipo A:12 es el más

frecuente con un 47% de los aislados, seguido del D:3 con un 30,5% y del A:3 con un 12% de los aislados (Percy *et al.*, 1984); en Estados Unidos el serotipo más frecuente parece ser el A:12 que representa el 32-33% de los aislados, el A:3 con el 16%, mientras que las A: no tipificable representarían el 30-50% de las *P. multocida* aisladas (Lu *et al.*, 1983).

En cerdos, a nivel de matadero, (Pijoan *et al.*, 1983) encontraron que las cepas aisladas de pulmones eran mayoritariamente A:3,5. En cambio los casos de septicemia hemorrágica parecen estar provocados por las serovariedades B:2, B:5 y B:2,5 (Townsend *et al.*, 1998).

En aves, las cepas causantes de peste aviar corresponden a las serovariedades A:1, A:3 y B:4 (Rhoades *et al.*, 1992)

En cuanto a bovinos y ovinos, las cepas causantes de septicemia hemorrágica son predominantemente B:2, E:2 y B:3,4 (Alwis, 1995), mientras que las aisladas de neumonías suelen ser A:3 y A:3,4 (Purdy *et al.*, 1997).

### 1.2.3 PATOGENIA Y MARCADORES DE VIRULENCIA.

En las aves, en el ganado bovino y ovino, en los conejos y en los casos de rinitis atrófica o de septicemia hemorrágica del cerdo, las cepas de *P. multocida* involucradas parecen capaces de provocar la enfermedad sin que sea necesaria la participación de otros agentes infecciosos (Gourlay *et al.*, 1989; Glavits and Magyar, 1990; Rhoades and Rimler, 1990; DiGiacomo *et al.*, 1993; Redondo *et al.*, 1993). En todo caso, no se puede descartar la participación de otros microorganismos, así como de factores externos al animal, en la gravedad del cuadro clínico. En cambio, en la producción de neumonías porcinas, se han involucrado toda una serie de agentes infecciosos (Amass *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Ciprian *et al.*, 1994). Según (Coudert *et al.*, 1986), la pasteurelisis del conejo se inicia con la colonización de las vías respiratorias superiores; y es, a partir de este lugar, desde donde se alcanzan otros órganos.

En la capacidad de colonizar las fosas respiratorias, parecen jugar un papel importante determinados factores asociados a la bacteria. Así, la producción de toxina favorecería

la colonización de fosas respiratorias (Pijoan and Trigo, 1990; Suckow et al., 1995). Las fimbrias (Glorioso et al., 1982) y determinadas proteínas de la membrana externa (Lu et al., 1991a) pueden participar también en la fase de colonización nasal, y lo mismo se puede decir para el lipopolisacárido (Lebrun et al., 1992; Jacques et al., 1993). Por último, la producción de ciertas enzimas proteolíticas capaces de degradar inmunoglobulinas (Pouedras et al., 1992; Negrete-Abascal et al., 1999), complementaría la serie de mecanismos intrínsecos favorecedores de la colonización de las vías respiratorias altas por parte de *P. multocida*. La cápsula, un elemento generalmente asociado a virulencia, no parece desempeñar ningún papel positivo en la fase de colonización de las vías respiratorias altas y su presencia sería, por el contrario, un factor negativo (Jacques et al., 1993).

En las fosas nasales, *P. multocida* no queda siempre en estado latente, desencadenando a veces un cuadro clínico. En el conejo, los principales signos de este cuadro son la secreción nasal mucopurulenta, los ruidos respiratorios característicos y la dificultad respiratoria, asociada frecuentemente con conjuntivitis, que recibe el nombre de rinitis o coriza (Webster, 1924). En el caso de colonización nasal por parte de cepas productoras de toxinas, puede producirse un cuadro más grave, con alteración de cornetes nasales, conocido con el nombre de rinitis atrófica (DiGiacomo et al., 1989; DiGiacomo et al., 1993). Cuadro también observado en cerdos (Jong, 1992). Un mecanismo de actuación de la toxina fue apuntado por (Rosendal et al., 1995) al comprobar que estimulaba la liberación de IL-6, una interleucina implicada en la reabsorción ósea.

A partir de las fosas nasales, algunas cepas de *P. multocida* serían capaces de alcanzar otros puntos del conejo originando una amplia variedad de cuadros clínicos. Cuadros clínicos que incluyen otitis media (Fox et al., 1971; Zinder et al., 1973; Flatt et al., 1977; Coudert et al., 1986), necrosis del pabellón auricular (Badiola-Sáiz et al., 1992), meningitis y encefalitis (Kpodekon, 1983), neumonía (Webster, 1926; Badiola-Sáiz et al., 1992), abscesos cutáneos (DiGiacomo et al., 1983), peritonitis (Bjotvedt et al., 1979), metritis (Thigpen et al., 1978; Holmes et al., 1983; Jonson y Wolf, 1993) y orquitis (Flatt, 1974).

En las aves se ha demostrado que algunas cepas son altamente invasoras, alcanzando otros órganos del animal en pocas horas (Rhoades and Rimler, 1990; Matsumoto *et al.*, 1991).

Como puede verse, la gama de posibilidades es muy amplia y, como hemos podido observar (Badiola-Sáiz *et al.*, 1992), las cepas causantes de ciertos cuadros son diferenciables de las cepas causantes de otros mediante biotipificado.

El tipo de cápsula jugaría un papel importante como marcador de virulencia en el caso de producción de procesos neumónicos, como lo demuestran (Percy *et al.* 1986) al comprobar, experimentalmente, que las de tipo capsular A inducen lesiones pleurales y pulmonares severas, mientras que las de tipo capsular D producen lesiones pleurales y pulmonares mínimas. La cápsula confiere a la *Pasteurella* una mayor resistencia a la fagocitosis (Harmon *et al.*, 1991) y su pérdida comporta una severa reducción en el grado de virulencia para ratón (Jacques *et al.*, 1993). Despista, no obstante, el hecho de que no parece expresarse en gran cantidad *in vivo* (Jacques *et al.*, 1994).

El lipopolisacárido sería otro factor de virulencia, como se describe en una publicación reciente (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1997). En este artículo se señala una reducción de la mortalidad tras provocar una mutación en el gen *galE* de *P. multocida*. Relaciones entre la composición del lipopolisacárido y el grado de virulencia han sido descritas también por otros autores (Lebrun *et al.*, 1992; Coy *et al.*, 1997).

Ciertas características se han asociado con la virulencia de algunas cepas, pero no se ha encontrado ninguna asociación con cambios estructurales de la bacteria. Así, la capacidad de invadir células (Lee *et al.*, 1994) o el grado de supervivencia en las células fagocitarias (Harmon *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1995), son ejemplos de características relacionadas con el grado de virulencia de las cepas de *P. multocida*.

Algunos plásmidos de *Pasteurella* no parecen estar relacionados con la virulencia de las cepas como ha sido demostrado por (Diallo *et al.*, 1995), aunque otros pudieran conferir un mayor grado de resistencia al complemento (Lee *et al.*, 1991; Lee and Wooley, 1995), propiedad que estaría relacionada con la virulencia (Snipes and Hirsh, 1986; Morishita *et al.*, 1990).

Además de los factores propios de la bacteria, mencionados arriba, otros factores ajenos a *P. multocida* facilitan la colonización de fosas respiratorias y por lo tanto la infección de los animales. Dentro de estos factores se incluyen otros agentes infecciosos, como *Bordetella bronchiseptica* (Kamp y Kimman 1988; Chanter, 1990), ciertos virus (Jericó and Carter, 1985; Sivanandan *et al.*, 1991) o *Mycoplasma spp.* (Ciprian *et al.*, 1994). Factores medioambientales tales como el amoníaco (Morisse *et al.*, 1978; Hamilton *et al.*, 1996), la tasa de ventilación (Morisse, 1981), el polvo (Reme, 1981), los cambios bruscos de temperatura (Morisse, 1981) o el tipo de explotación (Rosell *et al.*, 1992), están claramente implicados como favorecedores de la colonización bacteriana de vías respiratorias, incluida *P. multocida*.

#### 1.2.4 INMUNOPROFILAXIS

Si los antibióticos son la base del tratamiento de los casos clínicos, las vacunas son los medios de utilizar para la prevención de la infección. Mucho se ha investigado en este campo desde hace bastantes años pero, desgraciadamente, los resultados obtenidos no pueden considerarse satisfactorios (Cameron and Bester, 1983). No obstante, la introducción de la biología molecular, en el terreno del diseño de nuevas vacunas, puede aportar las soluciones esperadas (Hertman *et al.*, 1980; Homchampa *et al.* 1997).

La mala protección cruzada –protección obtenida tras el enfrentamiento con una cepa diferente de la vacuna- que se obtiene con bacterinas de tipo estándar y los mejores niveles de protección cuando el enfrentamiento se hace con la misma cepa vacuna (Rebers and Heddleston, 1977), sugieren que los antígenos básicos para neutralizar la infección por *P. multocida* serían algunos componentes tipo sacáridos capsulares de la bacteria. Estos mismos autores observaron, que los pases sucesivos *in vitro* hacían desaparecer ciertos antígenos importantes en la respuesta inmunitaria cruzada de tipo neutralizante.

Reforzando lo anterior, algunos autores han concluido que los antígenos importantes para la neutralización son específicos de cepa (Cameron *et al.*, 1980).

Según ciertos autores, el LPS no parece ser vital a la hora de instaurar una respuesta inmunitaria capaz de neutralizar a la bacteria (Adler *et al.*, 1996; Muniandy *et al.*, 1998), aunque otros ensayos han demostrado cierto grado de eficacia (Fichen *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1993). La cápsula, por el contrario, sí que es un antígeno a tener en cuenta (Nagy and Penn, 1976) aunque, por su naturaleza química, no es altamente inmunogénica (Fenwick, 1995).

Los antígenos asociados a la membrana externa jugarían un papel importante en la respuesta inmunitaria contra *P. multocida*, como se deduce de los resultados obtenidos por varios autores (Lu *et al.*, 1991b; Rimler, 1994; Kasten *et al.*, 1995; Confer *et al.*, 1996; Pati *et al.*, 1996). Además, y como sucede con otras bacterias, la respuesta inducida contra las proteínas captadoras de hierro puede tener un importante papel en la respuesta inmunitaria de tipo neutralizante (Adler *et al.*, 1996).

En contra de lo que sucede con la respuesta necesaria para controlar la colonización nasal o las infecciones generales, está ampliamente demostrada la capacidad del toxoide de *P. multocida* para instaurar una perfecta respuesta inmunitaria, capaz de neutralizar los efectos de la toxina termolábil causante de rinitis atrófica (Frymus *et al.*, 1989; Bording and Coged, 1991; Confer, 1993; Sakano *et al.*, 1997).

Se han hecho intentos para utilizar cepas vivas atenuadas como inmunoestimulantes contra *Pasteurella*. Algunos grupos han obtenido resultados no muy alentadores (Deeb *et al.*, 1989), mientras que otros, en modelos con animales de laboratorio, han logrado buenos resultados (Homchampa *et al.*, 1992, 1997). Para la prevención de la pasteurelosis aviar se ha utilizado una cepa de baja virulencia como vacuna (Toth *et al.*, 1988; Pranter *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1990), aunque no está exenta de problemas (Hopkins *et al.*, 1998). En caso de terneros también se ha descrito una vacuna atenuada eficaz (Chengappa *et al.*, 1989). Algunas cepas dependientes de estreptomycinina se han apuntado como posibles vacunas (Catt *et al.*, 1985; DiGiacomo *et al.*, 1987) y recientemente una cepa AroA<sup>-</sup> ha mostrado resultados muy esperanzadores (Scout *et al.*, 1999). La investigación en el desarrollo de vacunas vivas atenuadas ha de ser uno de los campos a insistir en el futuro.

Aparte del inmunógeno, a la hora de utilizar una bacterina deben tenerse en cuenta otros factores adicionales como el tipo de adyuvante, la ruta de inoculación y el número de dosis a administrar.

En referencia al primer punto, cabe decir que tanto el hidróxido de aluminio como los adyuvantes de tipo oleoso parecen ser satisfactorios como estimulantes de la respuesta a bacterias inactivadas o a componentes bacterianos (Sheik *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 1997; Verma and Jaiswal, 1998).

En cuanto a las posibles vías de inoculación debe puntualizarse que la vía endovenosa, utilizada solamente con fines experimentales, produce efectos indeseables en el sentido de una potenciación de la infección y del grado de lesiones (Al-Lebban *et al.*, 1989). La vía subcutánea, la más utilizada, da los resultados erráticos conocidos, y es altamente dependiente del antígeno y del adyuvante usado.

La tercera vía, que a mi entender debe ser explorada más profundamente, es la oral o la ocular. Estas rutas son capaces de estimular la "inmunidad de mucosas". Los resultados obtenidos por ciertos autores son esperanzadores (Al-Lebban *et al.*, 1988, 1989; Hofacre *et al.*, 1989; Suckow *et al.*, 1996). Las vacunas administradas por estas vías pueden potenciarse con la administración conjunta del componente B de la toxina colérica (Suckow *et al.*, 1995).

En el caso de las vacunas inactivadas, han de aplicarse dos dosis —una primo vacunación más una dosis de refuerzo a los 15 o 21 días—, mientras que en el caso de vacunas vivas atenuadas el número de dosis a aplicar podría ser de una (Verma and Jaiswal, 1998).

### 1.2.5 QUIMIOTERAPIA

Las manifestaciones clínicas y las pérdidas en productividad, tras el desencadenamiento de la sintomatología, deben controlarse mediante la utilización de antibióticos y quimioterápicos. Además, no es infrecuente la utilización de medicaciones preventivas con quimioterápicos —profilaxis medicamentosa o metafilaxia— en ciertos momentos que, por el historial de la granja, se espera una mayor incidencia de problemas infecciosos concretos.

La quimioterapia contra esta infección bacteriana, al igual que contra las demás, debe ser racional. Este término implica, por un lado la responsabilización de la intervención terapéutica por parte de un veterinario clínico, que ajuste el tipo de producto a utilizar, la dosis, la vía de administración y la duración; y por otro, la necesidad de conocer el grado de sensibilidad *in vitro* del microorganismos a los diferentes antibióticos y quimioterápicos.

La mayoría de los aislamientos de *P. multocida* son altamente sensibles a las penicilinas (Mortensen *et al.*, 1998), aunque se han descrito cepas resistentes (Badiola-Sáiz *et al.*, 1992).

Se han descrito resistencias al cloranfenicol, determinadas por plásmidos codificantes de la cloranfenicol acetil transferasa, en cepas de bovino (Vassort-Bruneau *et al.*, 1996). En aves se han aislado cepas resistentes a la estreptomina, trimetoprim y lincomicina sin relación aparente con plásmidos R (Diallo *et al.*, 1995). En cerdos la resistencia a clindamicina parece ser generalizada, y algunas cepas pueden presentar una resistencia plasmídica a sulfonamidas y a estreptomina (Cote *et al.*, 1991). En conejo se han aislado cepas resistentes a penicilina, sulfonamidas, estreptomina, espiramicina, gentamicina, tetraciclina o tobramicina (Badiola-Sáiz *et al.*, 1992), con ciertas diferencias en el patrón de resistencias según el origen anatómico de la cepa.

Los antimicrobianos más utilizables contra procesos causados por *P. multocida* serían: beta-lactámicos –con o sin inhibidores de la beta-lactamasas-, cefalosporinas, macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas o trimetoprim: sulfamida (Mortensen *et al.*, 1998), aunque es recomendable tener un conocimiento lo más actualizado posible del grado de sensibilidad *in vitro* de las cepas circulantes en la granja o, mejor aún, de las cepas circulantes en la zona geográfica de interés.

Por regla general, la quimioterapia contra *P. multocida* en animales debe aplicarse durante 4 ó 6 días y, en cada caso, deben respetarse escrupulosamente los períodos de retirada.

### 1.3 JUSTIFICACION

De acuerdo a la revisión encontrada sobre *Pasteurella multocida* tipos A y D; no se ha determinado la composición química que forma la estructura de su cápsula; pero existen algunos datos experimentales reportados sobre *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los cuales han empleado técnicas químicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear (RMN) y algunos métodos analíticos cualitativos, para determinar la presencia de oligo y polisacáridos, compuestos predominantes en la cápsula bacteriana. Esto ha sido de gran ayuda para determinar la estructura química de la cápsula de algunos serotipos (del 1 al 6) en el *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Trabajos previos nos muestran que el material capsular de células de *P. multocida* tipos A y D, ha sido observado por técnica de transmisión en microscopía electrónica, teñido por ferritina, encontrando que la cápsula del tipo A es gruesa (70 – 90 nm) y de forma regular; mientras que la del tipo D es delgada (20 – 30 nm) y de forma irregular. (Jacques and Foiry B., 1987).

Se ha evaluado también la presencia de ácido hialurónico en extractos capsulares de *P. multocida* tipo A por el Método de cromatografía. (Manley, 1965); comprobándolo por Métodos turbidimétricos. (Seastone, 1943).

En pruebas con extractos capsulares tipo D no se encontró ácido hialurónico, aunque se piensa que podría tener algún polisacárido ácido distinto.

Teniendo en cuenta que existen similitudes entre *A. pleuropneumoniae* y *P. multocida*, además de basarnos en los datos anteriores probaremos estas técnicas para tratar de determinar la estructura química de la cápsula de *P. multocida* tipos A y D así como sus semejanzas y diferencias estructurales, en cepas de referencia ATCC.

## 1.4 HIPOTESIS

Si se obtiene el polisacárido capsular de *Pasteurella multocida* de los serotipos A y D, utilizando técnicas químicas espectroscópicas como RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C y técnicas espectrofotométricas como el IR, entonces conoceremos su estructura y su caracterización.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar estructuralmente a los polisacáridos capsulares en cepas de referencia de *Pasteurella multocida* Tipos A y D.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislamiento del polisacárido capsular.
- Purificación del polisacárido capsular.
- Caracterizar estructuralmente a los polisacáridos capsulares de *Pasteurella multocida* cepas A y D mediante técnicas espectroscópicas comunes: Espectrofotometría de absorción infrarroja (IR), Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ).
- Finalmente, con base en los resultados anteriores, se propone realizar algunas pruebas químicas para determinar tipo y secuencia de sacáridos.

### 3.0 MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 CEPAS DE REFERENCIA ATCC (American Type Culture Collection)

Para realizar el presente trabajo, se utilizaron cepas de referencia ATCC de *P. multocida* tipos A y D. NOMENCLATURA: Tipo A HPM A 163- 66, Tipo D 3608.

#### 3.2 PRUEBAS DE IDENTIFICACION

##### PRUEBAS BIOQUIMICAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS DEL GENERO Y ESPECIE.

Se sembraron placas de agar nutritivo y agar sangre con las respectivas cepas de *Pasteurella multocida* tipos A y D, y se incubaron en la estufa bacteriológica a 37° C durante 12-15 horas.

A las colonias purificadas se les realizaron las pruebas bioquímicas primarias y secundarias de *Pasteurella multocida*.

En relación a lo publicado por diversos autores, se determinó que las pruebas bioquímicas mínimas para la identificación de la especie de *Pasteurella* deberían incluir:

Tinción de Gram, oxidasa, catalasa, oxidación - fermentación, motilidad, crecimiento en agar Mc Conkey, hemólisis en agar sangre al 3% , indol, ureasa, producción de ácido sulfhídrico, producción de ácido a partir de la glucosa, sacarosa, manitol, rafinosa, trehalosa y arabinosa. También se tomaron en cuenta las características morfológicas de las colonias, y aroma del cultivo.(Mc Allister y Carter, 1974. Cowan y Steel, 1974).

Prueba Bioquímica	Lectura
Crecimiento en Mc Conkey	(-)
Tinción de Gram.	(-)
Morfología.	
Cocobacilos.	
O/F	(F)
Catalasa.	(+)
Oxidasa.	(+)
Ureasa	(-)
Citrato	(-)
SIM. Sulfhídrico.	(-)
Indol.	(+)
Motilidad.	(-)

FIGURA 2.- PRUEBAS BIOQUIMICAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS PARA *Pasteurella multocida* (Cowan, 1982).

### 3.2 TIPIFICACION DE *Pasteurella multocida* tipo A

Se realizó una prueba de descapsulación de *Pasteurella multocida* en cajas de agar sangre con *Staphylococcus aureus* para tipificar el serotipo A. Se sembró *Pasteurella multocida* y se colocó una estría de *Staphylococcus aureus* en el centro, se incubaron las cajas 24h / 37° C y se observó el crecimiento ( Carter y Rudell, 1975), (Mendoza, 1989).

#### 3.2.1 PURIFICACION DE LA CAPSULA METODOLOGIA (Altman, 1988; Beyton, 1992).

La extracción de la cápsula se realizó en cada caso por separado, el tratamiento fué similar para cada uno de los tipos de *Pasteurella multocida* A y D.

Se sembró la *Pasteurella multocida* tipos A y D cepas ATCC (Cepas bacterianas de colección, American Type Cell Culture) en botellas planas estériles preparadas con anterioridad con agar papa, incubando a 37° C / 12 -24 h en la estufa bacteriológica.

Al tener el crecimiento de las bacterias se lavaron con SSF estéril, y se centrifugaron a una velocidad de 950 g / 15 min.

De aquí, se tenían dos partes: el Sobrenadante y la Pastilla.

Las pastillas se suspendieron en PBS pH 6.8 al 0.1 M, esto para tener una hidrólisis ligeramente ácida, la cual nos sirve para romper algunos enlaces y dejar libre la cápsula. Esta se agitó durante 2 h a 100 rpm y se volvió a centrifugar a 950 g / 10 min., teniendo de nuevo dos partes: el sobrenadante y la pastilla. Esta vez se hace dos veces, y se obtienen dos sobrenadantes.

Se juntaron los sobrenadantes y se filtraron por membrana millipore de 0.22 nm para eliminar restos bacterianos.

Se agregaron 5 volúmenes de acetona fría, y se dejó reposar toda la noche con el objeto de precipitar los carbohidratos ya que éstos son insolubles en acetona.

Se volvió a centrifugar ahora a 1900 g/25 min. Obteniendo: el sobrenadante el (acetona) y la pastilla.

A esta pastilla se le dejó evaporar todo resto de acetona y se disolvió en agua desionizada, se colocó en membrana para diálisis en un vaso con agua desionizada durante 2 h con agitación magnética. Esto se hace dos veces de la misma manera.

Pasado este tiempo se procedió a centrifugar a 950 g / 25 min., dándonos un sobrenadante y una pastilla.

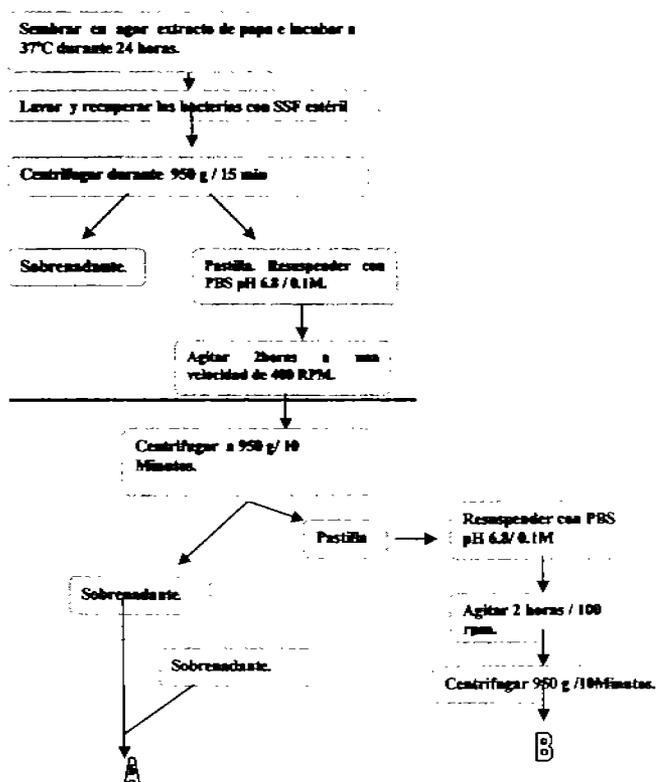
Este sobrenadante fue tratado con 0.5 volúmenes de cloroformo – butanol en relación 5:1; con esto eliminamos lípidos y proteínas quedándonos solamente el polisacárido capsular en fase acuosa disuelto. Se efectuaron extracciones orgánicas hasta desaparecer la emulsión residual. Se le agregó una disolución de acetato de sodio pH 6.05 hasta una concentración de 5 %. Esto con el fin de tener una fuerza iónica necesaria para precipitar al polisacárido.

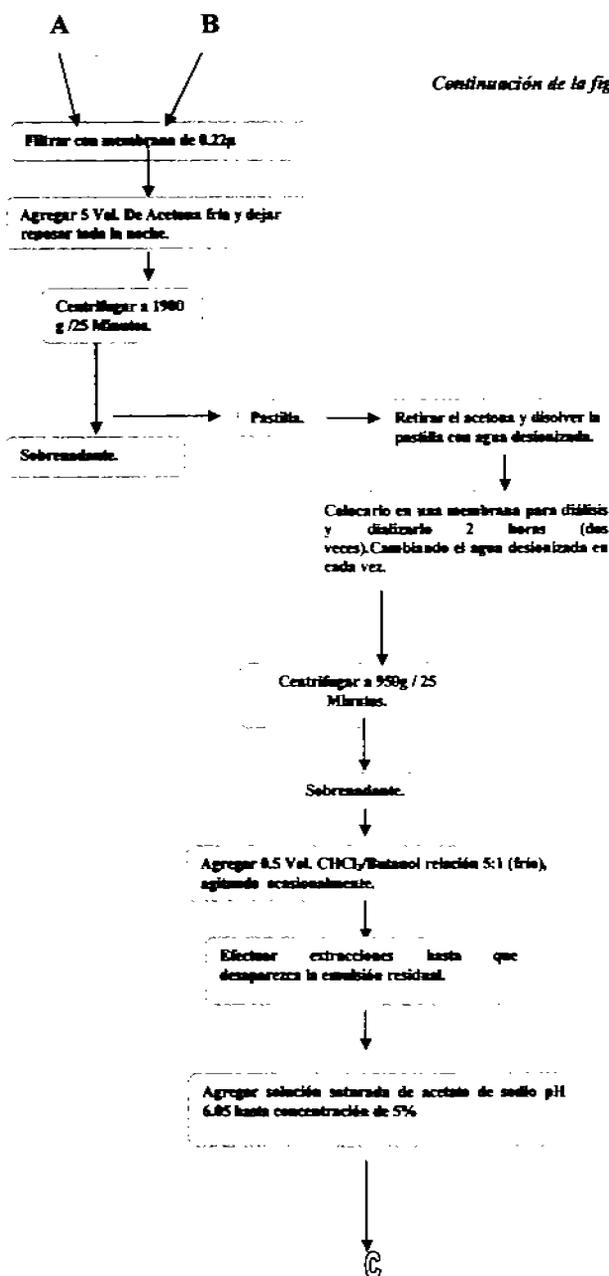
Se adicionó acetona a -20° C (de 1 a 1.5 volúmenes).

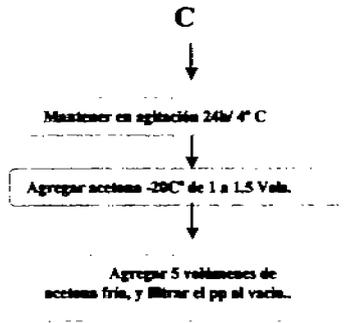
Se mantuvo en agitación durante todo un día a 4° C, agregando después de ese tiempo 5 volúmenes de acetona o cloroformo frío y se separó por filtración el precipitado.

Durante la extracción de la cápsula se fueron realizando determinaciones de carbohidratos, proteínas y lípidos. Además de realizarles las pruebas químicas. Como se observa en la (figura 3).

FIGURA 3.-METODOLOGIA PARA EXTRACCION DE LA CAPSULA: DIAGRAMA DE FLUJO







### 3.4 DETERMINACIONES EFECTUADAS

#### 3.4.1 CARBOHIDRATOS (Dubois M., Pilles K., 1956).

Con éste método se cuantifican azúcares simples, oligo y polisacáridos y sus derivados con grupos reductores libres o potencialmente libres. Es ventajoso ya que no se requiere de hidrólisis previa. Sin embargo no es aplicable con amino azúcares, derivados alcohólicos y no es suficientemente sensible con pentosas. El método es utilizado particularmente para la estimación de azúcares separados por cromatografía en papel. Se utilizaron: 5.5 ml de Fenol líquido (90%) y 94.5 ml de agua destilada, ácido sulfúrico concentrado y Dextrán 10 microgramos por microlitro.(Standard).

**METODO:** Se colocaron 200 microlitros de muestra con 200 microlitros del reactivo de fenol. Rápido y con mucho cuidado se agregó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agitó. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min y se incubó a 30° C / 20 min. Se leyó a 490 nm. El color fué estable de 2 a 3 h a temperatura ambiente.

En la ( figura 4) se muestra la grafica patrón que se elaboró en condiciones similares con concentraciones conocidas de glucosa.

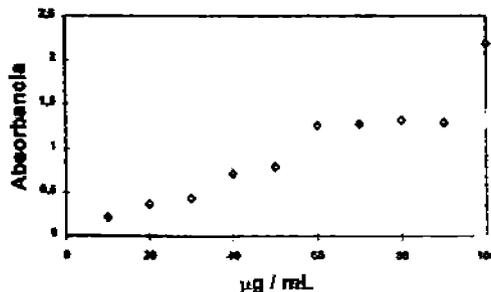


Figura 4.- Patrón para determinación de carbohidratos (Dubois, 1987).

### 3.4.2 DETERMINACION DE PROTEINAS (Bradford, M. 1976).

El reactivo que se utilizó fue azul de comassie brillante G-250 el cual se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 100 mg de Azul de Comassie en 50 ml de Etanol al 95 % y se le agregaron 100 ml de Ácido fosforico al 85% w/v hasta completar 1 lt.

METODO MICRO: Se pipeteó en un tubo de ensayo 0.1 ml de solución de proteína conteniendo de 1 a 10 microgramos. Se le agregó 1 ml del reactivo de Comassie y se mezcló. Se leyó su absorbancia a 595 nm.

El estándar de proteína que se utilizó fue albúmina para la elaboración de la curva patrón.( figura 5 ) los valores de las muestras fueron interpolados en la recta .

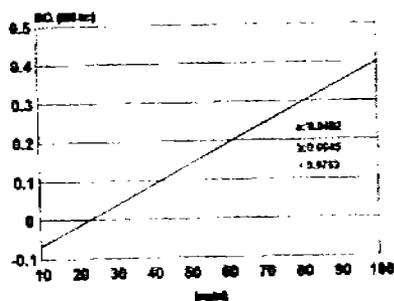


Figura 5.- PATRON PARA DETERMINAR PROTEINAS ( Bradford, 1985).

### 3.4.3 DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES (METODO DE LA FOSFOVAINILLINA (Zollneer, 1975).

Se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico concentrado a 0.1 ml de la muestra y se agitó. Se calentó 10 minutos a Baño Maria (protegiendo los tubos con tapón de algodón). Se enfrió con Baño de agua fría durante 5 minutos, se tomó de aquí una alícuota de 0.1 ml en un tubo. El tubo Blanco se trabajó con 0.1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se le agregó 5 ml del reactivo 3 a cada tubo y se agitaron. Se incubó a 37 ° C durante 15 minutos. Se enfriaron 5 minutos a temperatura ambiente, y se leyeron las Absorbancias a 540 nm. NOTA.- el color fué estable 10 minutos.

CALCULOS:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 385 = \text{mg/ dl}$$

Absorbancia del estándar

### 3.5 CROMATOGRAFIA (Manley, 1965).

Este método ha sido utilizado en diversas áreas para caracterizar, separar, purificar e identificar a los compuestos presentes en una muestra. En placas de celulosa empleando como eluyente una disolución 3 M de cloruro de sodio; se colocaron muestras de los extractos capsulares de *P. multocida* y en forma similar se colocaron muestras de ácido hialurónico.

### 3.6 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para estas pruebas se colocó la mínima cantidad de extracto capsular en tubo de ensayo agregándole unas gotas de cada disolvente, se agitaron y se observó si hay o no solubilidad además de ver el grado de solubilidad que presentan en cada uno. Se probaron: Acetona, Etanol, Metanol y Dimetil Sulfóxido.

### 3.7. PRUEBAS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION EN EL IR\*

El análisis por espectrofotometría de absorción infrarroja se basa en la interacción de las moléculas orgánicas con la energía infrarroja proporcionada por la radiación en el espectro electromagnético en la región del infrarrojo ( $4000- 400 \text{ cm}^{-1}$ ). Siendo algunos de sus usos los que a continuación se muestran:

- Identificación de grupos funcionales en un compuesto orgánico.
- Confirma la identidad de un compuesto por comparación con el espectro de una muestra conocida.

El espectro de absorción infrarroja obtenido para el ácido hialurónico, se llevó a cabo en un Espectrómetro Perkin Elmer modelo 283, utilizando la técnica de pastilla (KBr), las bandas de absorción están dadas en ( $\nu$ ) expresadas en  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.8. PRUEBAS DE ESPECTROSCOPIA RMN<sup>1</sup>H Y RMN<sup>13</sup>C\*

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), representa básicamente otra forma de espectroscopia de absorción; bajo condiciones adecuadas, una muestra (generalmente orgánica), suele absorber radiación electromagnética, específicamente ondas de radiofrecuencia, mediante ciertos núcleos que componen a las moléculas en estudio, sobre todo de manera particular cuando éstas, están dentro de un campo magnético intenso.

---

\* Para una presentación ampliada y en consecuencia más de fondo de los dos métodos espectroscópicos antes mencionados se consideró apropiado incluir un *Apéndice ad hoc*, al final de este trabajo. (Mizanda R., 2004).

Subjetivamente, esta técnica suele proporcionar como información una radiografía molecular carbono - hidrógeno.

Esta técnica es utilizada para determinar la estructura molecular de compuestos orgánicos, sirve también para realizar análisis cuantitativos; logra también plantear un sistema de ecuaciones simultáneas de las que se obtienen las fracciones en peso de los componentes de una mezcla. Y por último y sin menor importancia que lo anterior, identifica, trazas de un componente en cierta muestra.

En un espectrómetro de RMN, se somete la muestra orgánica a un intenso campo magnético que hace que los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la molécula se alineen a éste, en una de dos orientaciones posibles para luego ser irradiadas con energía del orden de la radiofrecuencia.

Éste, suele estar equipado para hacer variar el campo magnético y mantener constante la radiofrecuencia, al variar el valor de  $H_0$  y graficar como función de la cantidad de energía que se absorbe se adquiere una representación química llamada espectro de resonancia magnética nuclear.

#### **METODOLOGIA DE LA HIDRÓLISIS ACIDA DEL EXTRACTO CAPSULAR DE *P. multocida* TIPO D.**

Para la hidrólisis ácida del extracto capsular, se preparó una mezcla acuosa de 5 mL del sustrato a una concentración de 50 mg/ mL. A ésta se le añadieron 5 mL de HCl 0.1 M hasta un pH 1-2. Seguidamente, la disolución resultante, se sometió a 80° C en baño termostataado por espacio de 60 min; transcurrido el tiempo, se colocó el recipiente respectivo en baño de agua fría y se ajustó el pH a 7 con NaOH 0.1 M. La mezcla final, se liofilizó ( 100 mmHg /  $\text{Me}_2\text{CO}$  /  $\text{CO}_2$  sólido ).

Los componentes se separaron por cromatografía en placa preparativa empleando celulosa como soporte y disolución de NaCl 3.0 M como eluyente, las dos fracciones presentes se separaron y extrajeron por separado eliminando finalmente el disolvente, antes de proceder a su identificación. Es conveniente mencionar que el revelado se realizó con vapores de yodo por los extremos derecho- izquierdo de la placa.

## 4.0 RESULTADOS

### IDENTIFICACION Y PURIFICACION DE LAS CEPAS

Las cepas de referencia de *P. multocida* tipos A y D proceden del Banco de la American Type Culture Collection (ATCC) con la siguiente nomenclatura: Tipo A HPM A 163- 66, Tipo D 3608.

Se observó un crecimiento bacteriano favorable en ambos tipos de cepas; a las cuales se le realizaron las pruebas bioquímicas de identificación y caracterización.

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADOS	
	"tipo A"	"tipo D"
Cepas de <i>P. multocida</i>	"tipo A"	"tipo D"
Crecimiento en Mc Conkey	(-)	(-)
Tinción de Gram.	(-)	(-)
Morfología.	Cocobacilos	Cocobacilos
O/F	(F)	(F)
Catalasa.	(+)	(+)
Oxidasa.	(+)	(+)
Ureasa	(-)	(-)
Citrato	(-)	(-)
SIM. Sulfhídrico.	(-)	(-)
Indol.	(+)	(+)
Motilidad.	(-)	(-)

Figura 6.-Resultados de la identificación de *Pasteurella multocida* tipos a y d.

### PRUEBA DE DESCAPSULACION DE *Pasteurella multocida* tipo A.

Las colonias de *Pasteurella multocida* que crecieron cerca de la estría del *Staphylococcus aureus* se dice que han descapsulado Estas serán clasificadas como tipo A ya que es el tipo capsular que contiene el ácido hialurónico.

### EXTRACCION DE LA CAPSULA

Durante el procedimiento de la purificación y extracción de la cápsula de *P. multocida* se fueron efectuando determinaciones a cada paso para llevar un seguimiento de la composición de cada extracto, intercalando resultados en las gráficas patrón 1 y 2, en la determinación de lípidos las lecturas se obtuvieron con la ecuación correspondiente.

En la Figura 7, las determinaciones se llevaron a cabo en condiciones similares para ambos extractos capsulares, el A y el D; tomando una muestra en cada paso de dicha extracción se fueron efectuando determinaciones de carbohidratos, proteínas y lípidos. Se observó que al inicio se tenían resultados de carbohidratos, proteínas y lípidos (ver 1.-SSF), en el paso siguiente (PBS 1) bajan las concentraciones considerablemente en las tres determinaciones y en ambos tipos de extractos capsulares. En (PBS 2) se logra apreciar que las concentraciones de proteínas y lípidos bajan notablemente, permaneciendo el valor aproximadamente igual en los carbohidratos. Se logra observar que ya no se obtiene lectura de lípidos, y la concentración de proteínas tiende a desaparecer, a partir de este punto se considera que tenemos un tipo de carbohidrato solamente.

De la última parte de dicha extracción se precipitaron los extractos capsulares A y D, con acetona fría y posteriormente se filtraron al vacío. Observar en la siguiente (figura 7) los resultados de las determinaciones.

TRATAMIENTO (tipo capsular)	DET.CARBOHIDRATOS (Dubois mg/ml)		DET.PROTEINA (Bradford mg/ml)		DET.LÍPIDO (Zolner g/ml)	
	A	D	A	D	A	D
1. SSF	382.13	339.20	316.0	350.8	283.10	164.8
2. PBS (1)	149.76	134.20	128.2	130.4	44.9	31.2
3. PBS (2)	138.54	125.14	30.8	36.2	0	0
4. Acetona (1)	2.28	2.31	8.7	9.6	0	0
5. Dialisis	130.02	123.00	0	0	0	0
6. Extracción	125.80	119.20	0	0	0	0
7. Acetona (2)	0	0	0	0	0	0
8. Ext.cap. (pp.)	120.3	115.7	0	0	0	0
9. Peso seco, pp.	98.6	78.2	0	0	0	0

NOTA: Los valores negativos están en "0"

Figura 7. Resultados de las determinaciones realizadas.

## PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

A los precipitados se les realizaron pruebas de solubilidad para llevarlas a sus respectivos estudios de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e IR.

Se probaron los disolventes: Metanol, Etanol, Acetona y DMS (Dimetil sulfoxido).

EXTRACTO CAPSULAR	METANOL	ETANOL	ACETONA	DMS
A	+/-	+/-	+	+++
D Prod. "A"	+/-	+/-	++	+++
D Prod "B"	+/-	+/-	+	+++

FIGURA 8.- PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

NOTA: INSOLUBLE - PARCIALMENTE SOLUBLE +/- SOLUBLE + MUY SOLUBLE +++ Como se puede observar el mejor disolvente para los extractos capsulares fué el DMS.

## CROMATOGRAFIA:

Tomando en cuenta que un componente principal de la cápsula de *P. multocida* tipo A es ácido hialurónico (Estructura 1), se procedió en primera instancia a una determinación comparativa de éste, con los CPS de las muestras obtenidas de los extractos tipo A y D.

La cromatografía se realizó en cromatoplacas de celulosa, en éstas se aplicó muestra de ácido hialurónico para su determinación comparativa con las muestras de los extractos capsulares de *Pasteurella multocida* tipos A y D, obtenidos en las extracciones.

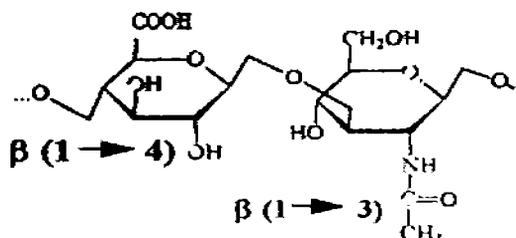


FIGURA 9.- Acido hialurónico (Acido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina )

## ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO

Posteriormente se llevo a cabo la respectiva determinación del estudio de Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo, lo cuál se observa en la figura 10.

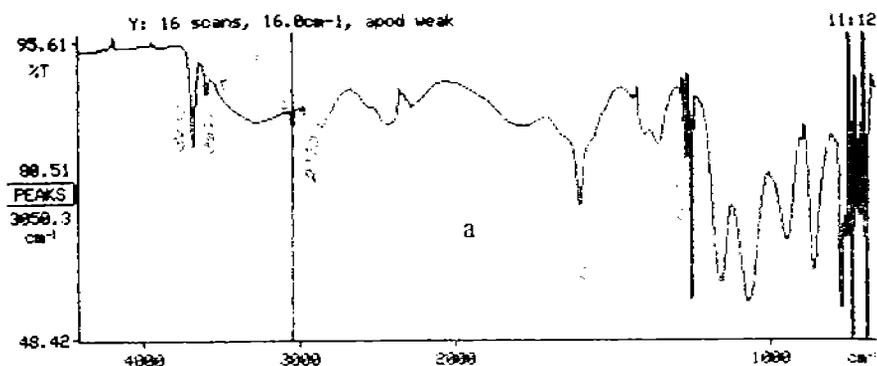


FIGURA 10.- IR del Extracto capsular de *Pasteurella multocida* tipo A.

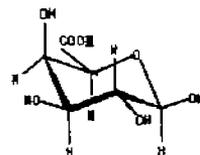
## ESTUDIO POR RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO CAPSULAR TIPO D.

La estructura de los productos formados mediante la hidrólisis ácida del extracto capsular tipo D se estableció mediante correlación de los datos de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C de las moléculas A y B con los publicados en la literatura.

Los espectros correspondientes son los indicados como 2-5; al respecto los de los de hidrógeno fueron determinados a 300 MHz y los de carbono a 75MHz siendo al disolvente DMSO - d<sub>6</sub> y la referencia interna el TMS. Los desplazamientos químicos son indicados como  $\delta$  ppm.

DMSO-d6 (400 MHz) TMS  
 Nombre: Acido D-galacturonico  
 Formula: C6H10O7  
 Peso: 176.126  
 SMILES: OC(O)C(O)C(O)C(O)C(O)C(=O)O

### Acido D-galacturonico



Chemical Shift (ppm)	Integration	Area	Area%
4.7	1.00	100	100
4.6	1.00	100	100
4.5	1.00	100	100
4.4	1.00	100	100
4.3	1.00	100	100
4.2	1.00	100	100
4.1	1.00	100	100
4.0	1.00	100	100
3.9	1.00	100	100
3.8	1.00	100	100
3.7	1.00	100	100
3.6	1.00	100	100
3.5	1.00	100	100
3.4	1.00	100	100
3.3	1.00	100	100
3.2	1.00	100	100
3.1	1.00	100	100
3.0	1.00	100	100
2.9	1.00	100	100
2.8	1.00	100	100
2.7	1.00	100	100
2.6	1.00	100	100
2.5	1.00	100	100
2.4	1.00	100	100
2.3	1.00	100	100
2.2	1.00	100	100
2.1	1.00	100	100
2.0	1.00	100	100
1.9	1.00	100	100
1.8	1.00	100	100
1.7	1.00	100	100
1.6	1.00	100	100
1.5	1.00	100	100
1.4	1.00	100	100
1.3	1.00	100	100
1.2	1.00	100	100
1.1	1.00	100	100
1.0	1.00	100	100
0.9	1.00	100	100
0.8	1.00	100	100
0.7	1.00	100	100
0.6	1.00	100	100
0.5	1.00	100	100
0.4	1.00	100	100
0.3	1.00	100	100
0.2	1.00	100	100
0.1	1.00	100	100

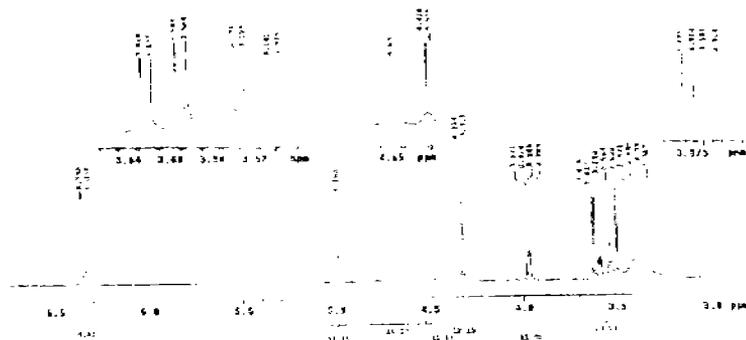
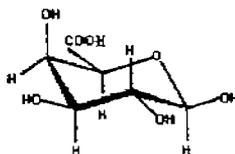


FIGURA 11.- RMN <sup>1</sup>H del producto A de hidrólisis acida del extracto capsular tipo D. DMSO-d6 / TMS A 300 MHz.

DMSO-d6 (400 MHz) TMS  
 Nombre: Acido D-galacturonico  
 Formula: C6H10O7  
 Peso: 176.126  
 SMILES: OC(O)C(O)C(O)C(O)C(O)C(=O)O

### Acido D-galacturonico



Chemical Shift (ppm)	Integration	Area	Area%
176	1.00	100	100
175	1.00	100	100
174	1.00	100	100
173	1.00	100	100
172	1.00	100	100
171	1.00	100	100
170	1.00	100	100
169	1.00	100	100
168	1.00	100	100
167	1.00	100	100
166	1.00	100	100
165	1.00	100	100
164	1.00	100	100
163	1.00	100	100
162	1.00	100	100
161	1.00	100	100
160	1.00	100	100
159	1.00	100	100
158	1.00	100	100
157	1.00	100	100
156	1.00	100	100
155	1.00	100	100
154	1.00	100	100
153	1.00	100	100
152	1.00	100	100
151	1.00	100	100
150	1.00	100	100
149	1.00	100	100
148	1.00	100	100
147	1.00	100	100
146	1.00	100	100
145	1.00	100	100
144	1.00	100	100
143	1.00	100	100
142	1.00	100	100
141	1.00	100	100
140	1.00	100	100
139	1.00	100	100
138	1.00	100	100
137	1.00	100	100
136	1.00	100	100
135	1.00	100	100
134	1.00	100	100
133	1.00	100	100
132	1.00	100	100
131	1.00	100	100
130	1.00	100	100
129	1.00	100	100
128	1.00	100	100
127	1.00	100	100
126	1.00	100	100
125	1.00	100	100
124	1.00	100	100
123	1.00	100	100
122	1.00	100	100
121	1.00	100	100
120	1.00	100	100
119	1.00	100	100
118	1.00	100	100
117	1.00	100	100
116	1.00	100	100
115	1.00	100	100
114	1.00	100	100
113	1.00	100	100
112	1.00	100	100
111	1.00	100	100
110	1.00	100	100
109	1.00	100	100
108	1.00	100	100
107	1.00	100	100
106	1.00	100	100
105	1.00	100	100
104	1.00	100	100
103	1.00	100	100
102	1.00	100	100
101	1.00	100	100
100	1.00	100	100
99	1.00	100	100
98	1.00	100	100
97	1.00	100	100
96	1.00	100	100
95	1.00	100	100
94	1.00	100	100
93	1.00	100	100
92	1.00	100	100
91	1.00	100	100
90	1.00	100	100
89	1.00	100	100
88	1.00	100	100
87	1.00	100	100
86	1.00	100	100
85	1.00	100	100
84	1.00	100	100
83	1.00	100	100
82	1.00	100	100
81	1.00	100	100
80	1.00	100	100
79	1.00	100	100
78	1.00	100	100
77	1.00	100	100
76	1.00	100	100
75	1.00	100	100
74	1.00	100	100
73	1.00	100	100
72	1.00	100	100
71	1.00	100	100
70	1.00	100	100
69	1.00	100	100
68	1.00	100	100
67	1.00	100	100
66	1.00	100	100
65	1.00	100	100
64	1.00	100	100
63	1.00	100	100
62	1.00	100	100
61	1.00	100	100
60	1.00	100	100
59	1.00	100	100
58	1.00	100	100
57	1.00	100	100
56	1.00	100	100
55	1.00	100	100
54	1.00	100	100
53	1.00	100	100
52	1.00	100	100
51	1.00	100	100
50	1.00	100	100
49	1.00	100	100
48	1.00	100	100
47	1.00	100	100
46	1.00	100	100
45	1.00	100	100
44	1.00	100	100
43	1.00	100	100
42	1.00	100	100
41	1.00	100	100
40	1.00	100	100
39	1.00	100	100
38	1.00	100	100
37	1.00	100	100
36	1.00	100	100
35	1.00	100	100
34	1.00	100	100
33	1.00	100	100
32	1.00	100	100
31	1.00	100	100
30	1.00	100	100
29	1.00	100	100
28	1.00	100	100
27	1.00	100	100
26	1.00	100	100
25	1.00	100	100
24	1.00	100	100
23	1.00	100	100
22	1.00	100	100
21	1.00	100	100
20	1.00	100	100
19	1.00	100	100
18	1.00	100	100
17	1.00	100	100
16	1.00	100	100
15	1.00	100	100
14	1.00	100	100
13	1.00	100	100
12	1.00	100	100
11	1.00	100	100
10	1.00	100	100
9	1.00	100	100
8	1.00	100	100
7	1.00	100	100
6	1.00	100	100
5	1.00	100	100
4	1.00	100	100
3	1.00	100	100
2	1.00	100	100
1	1.00	100	100

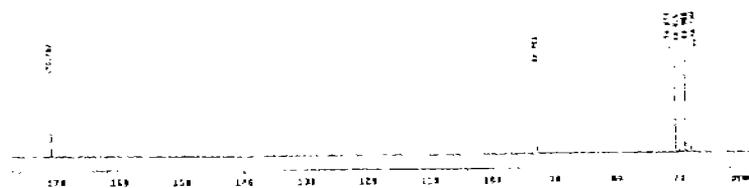


FIGURA 12.- RMN <sup>13</sup>C del producto A de hidrólisis acida del extracto capsular tipo D. DMSO-d6. TMS A 75 MHz.



## 5.0 DISCUSION

- ✓ *Pasteurella multocida* es un invasor extremadamente común del tracto respiratorio del cerdo. Se ha aislado a partir de pulmones aparentemente normales colectados en el rastro, aunque puede ser el resultado de la contaminación durante el escaldado, normalmente la bacteria esta considerada como un microorganismo incapaz de invadir al pulmón a menos que exista un factor predisponente. Sin embargo se ha demostrado que es el agente principal en las neumonías crónicas (Pijoan, 1985; Pijoan y Trigo, 1986; Ciprián, 1987; Ciprián *et al* 1988).
- ✓ Mediante pruebas microbiológicas y biológicas se han encontrado diferencias entre esta especie, lo que ha originado que se le clasifique en cuatro tipos; si se hace con pruebas de protección en ratón serian los tipos capsulares de Roberts denominados I, II, III y IV (Roberts, 1947), pero si se relaciona con los antígenos capsulares serian los tipos de Carter denominados A, B, D y E (Carter, 1955 y 1957) y que corresponderian de la siguiente manera I con B; II con A; III con E y IV con D. Las características antigénicas de *Pasteurella multocida* han sido determinadas por estudios inmunológicos empleando pruebas de hemoaglutinación indirecta, de autoaglutinación en presencia de acriflavina y de inhibición de la formación capsular por la enzima hialurodinasa (Carter y Subronto, 1973; Carter y Rundell, 1975).
- ✓ El aislamiento, identificación y serotipificación de *Pasteurella multocida* aislada a partir de pulmones neumónicos colectados en los rastros han revelado que el 97.3% son del tipo capsular A y el 2.7% del tipo capsular D y en efecto, la prevalencia de los tipos capsulares A y D en pulmones neumónicos favorece en forma muy significativa a los tipos A. En la flora nasal del cerdo con rinitis atrófica se ha encontrado que el 80% es del tipo capsular D y el 20% del tipo capsular A, y se debe al comportamiento del macrófago alveolar ya que esta célula es capaz de fagocitar a las pasteurelas tipos D, pero no a las tipos A, aparente debido a que estas poseen una espesa cápsula de ácido hialurónico que las protege de la fagocitosis (Pijoan, 1985).

- ✓ En la literatura no se encontraron las características químicas de las cápsulas de los tipos capsulares B, D y E, y en el caso de la cápsula tipo A se infiere por las propiedades de digestión del ácido hialurónico por la hialuronidasa testicular o de *Staphylococcus aureus* (Carter y Rundell, 1975).
- ✓ En la parte de la metodología microbiológica se obtuvieron los resultados consistentes reportados con anterioridad: tipificación, identificación, pureza, crecimiento adecuado en los medios de cultivo, pruebas bioquímicas primarias y secundarias correspondientes al género y especie de *Pasteurella multocida* ya que se trabajó con cepas del Banco de colección de la ATCC.
- ✓ La prueba de descapsulación ayudó a tipificar a las cepas de *Pasteurella multocida* tipo A basándonos en que *Staphylococcus aureus* contiene la enzima hialuronidasa, ésta logra descapsular a la cepa tipo A ya que contiene ácido hialurónico (Carter y Rundell, 1975).
- ✓ Con respecto al estudio de cromatografía, se tomó en cuenta que uno de los componentes principales de la cápsula de *Pasteurella multocida* tipo A es el ácido hialurónico (Pandit K., 1993).
- ✓ Como complemento de la identificación del ácido hialurónico, presente en el extracto capsular tipo A, posteriormente se efectuó un análisis comparativo por medio de espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (Figura 10). Este estudio particular arrojó resultados consistentes, entre lo informado en la literatura (Pandit K., 1993) y la muestra correspondiente al extracto capsular del tipo A. Al respecto es conveniente presentar las asignaciones de las bandas de absorción respectivas;  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr: 3680 (NH), 3000 – 3350 ancha(OH), 2990 (CH), 1600 – 1620 bandas superpuestas C=O ; CO<sub>2</sub>, 1100 (C-O-C).
- ✓ En relación al extracto capsular D, al no tener presencia de ácido hialurónico como resultado de la cromatografía respectiva, y al dar prueba positiva de carbohidratos, se procedió a realizar un análisis de éstos. Por tal razón se llevó a cabo una hidrólisis ácida del extracto correspondiente, aislándose dos productos después de cumplir con el protocolo experimental respectivo. Las moléculas obtenidas, de esta manera, fueron etiquetadas como sacárido A y sacárido B a efecto de ser analizadas mediante RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C.

- ✓ Con relación al sacárido A, los datos de RMN <sup>13</sup>C (Figura 12 ) muestran un conjunto de seis señales, indicativas de un compuesto con seis carbonos ; una de éstas señales (170.782 ppm) es característica de un carbonilo de ácido carboxílico; a su vez hay cuatro señales en (70.60, 69.87, 68.96 y 68.10 ppm) que de acuerdo a las características esperadas son congruentes para un sacárido, dado que las cuatro corresponden a núcleos de carbono base de átomos de oxígeno; así mismo, hay una señal en (92.75 ppm) que es adecuado asignarla al carbono anomérico, (C - 1). La serie de datos de RMN <sup>13</sup>C, antes presentados y discutidos, evidentemente son congruentes para la estructura de un monosacárido derivado de una aldohexosa, forma ácida en C-6. Por ende, al llevar a cabo una adecuada correlación con lo informado en la literatura, (Carter, 1957, Pandit, 1993). La estructura corresponde al ácido D-galacturónico. Es conveniente mencionar que los resultados anteriores, son también consistentes con los obtenidos en el respectivo espectro de RMN <sup>1</sup>H; en éste, existen una serie de protones con desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm 3.5 - 5.0) y acoplamientos apropiados (-aproximado a 2 Hz) característicos para monosacáridos en su forma piranosida. Esta información se complementa con la señal múltiple a (6.33 ppm) la cual integra para un protón asignado al del carbono anomérico.
  
- ✓ A su vez el sacárido B, como se observa en la (Figura 13) RMN <sup>1</sup>H y la (Figura 14) RMN <sup>13</sup>C, presenta comportamientos análogos a los discutidos para el sacárido A: Una serie de seis señales en RMN <sup>13</sup>C: una (170.64 ppm) para carbono de carboxilo, otra (97.42 ppm) correspondiente a (C - 1) anomérico y cuatro más (76.07 - 71.64 ppm) para bases de oxígeno con ambientes químicos también de este heteroátomo. La otra serie de señales, del espectro de RMN <sup>1</sup>H también muestra desplazamientos multiplicidades y acoplamientos consistentes también con una aldohexosa oxidada (ácido carboxílico). En consecuencia, la información obtenida para el sacárido B en correlación con lo reportado en la literatura (Carter, 1957; Pandit, 1993), permiten establecer que este es ácido D-glucurónico.

- ✓ Es adecuado mencionar que estos resultados permiten sugerir que la cápsula del tipo D es un polisacárido compuesto de dos ácidos: ácido D-galacturónico y ácido D- glucurónico.
- ✓ Por otro lado, estos resultados no son concluyentes ya que se obtuvo una cantidad muy pequeña del producto, por lo que fue difícil realizarle todas las pruebas características y estructurales. La extracción no fue del todo satisfactoria porque se pierde mucho producto, ya que de inicio se tenía una gran cantidad de biomasa bacteriana. Se recomienda un estudio exhaustivo al respecto. Este proyecto-tesis se realizó en 1997, en su momento tuvo validez, puesto que de acuerdo a la bibliografía que se tenía en ese entonces no mostraba muchos datos del tema, aunque se puede observar que en los resultados obtenidos se muestran algunos datos interesantes de la composición del extracto capsular de *Pasteurella multocida*, pero se recomienda seguir con el estudio para describir por completo la estructura química del polisacárido capsular de los tipos A y D de ésta bacteria.
- ✓ La cápsula parece ser un factor importante en la virulencia especialmente en el tipo A, ya puede ayudar a evitar la fagocitosis por los macrófagos alveolares, en trabajos realizados por (Jacques et al., 1994) sugieren que la poca cápsula es expresada cuando el organismo crece bajo condiciones de hierro restringidas y que esas condiciones de crecimiento asemejan el escenario que esta ocurriendo in vivo, de ahí la importancia de la virulencia de la cápsula pudo haber sido sobrestimada en el pasado.

## 6.0 CONCLUSIONES

Del estudio realizado en forma comparativa entre los extractos capsulares tipo A y D de *Pasteurella multocida* de cepas de referencia; se puede establecer que:

- ✓ Las determinaciones realizadas durante la extracción en ambos casos muestra al final una composición únicamente de carbohidrato.
- ✓ Tanto la muestra de referencia como la muestra problema del extracto capsular tipo A presentaron el mismo valor de Rf, en consecuencia se estableció que se trataba del mismo sacárido: el ácido hialurónico.
- ✓ El extracto capsular tipo D presentó Rf muy distinto a los otros dos, estableciendo así que la composición de dichos extractos son distintos y que éste no contiene el ácido hialurónico como se reporta en la literatura. (Manley, 1965).
- ✓ La cromatografía de partición en cromatoplasmas de celulosa permite confirmar la presencia del ácido hialurónico solamente en el extracto capsular tipo A.
- ✓ Como complemento del punto anterior, la Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo del extracto capsular tipo A permite confirmar la presencia del ácido hialurónico.
- ✓ Finalmente al extracto capsular tipo D se le realizaron reacciones de hidrólisis ácida obteniendo dos productos finales principales: producto A y producto B; a los que se les realizaron los estudios correspondientes de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C ( figuras 11,12,13 y 14). Mostrándonos su composición estructural y caracterizándolos como ácidos: D-galacturónico y D glucurónico.
- ✓ El impacto de este trabajo se pensó en que teniendo como antecedente que la cápsula parece ser un factor importante en la virulencia especialmente en el tipo A, ya puede ayudar a evitar la fagocitosis por los macrófagos alveolares. Además en trabajos realizados por (Jacques *et al.*, 1994) sugieren que la poca cápsula es expresada cuando el organismo crece bajo condiciones de hierro restringidas y que esas condiciones de crecimiento asemejan el escenario que esta ocurriendo *in vivo*, de ahí la importancia de la virulencia de la cápsula pudo haber sido sobreestimada en el pasado.

- ✓ Principalmente se pensaba encontrar una relación "estructura-actividad" de la cápsula de *Pasteurella multocida*. Dando con ello una ayuda para posteriores investigaciones que colaboraran en la protección de la enfermedad causada por ésta bacteria.
- ✓ Al caracterizar químicamente ( grupos funcionales) una estructura principal que forma parte de la composición de algún organismo ( en éste caso, *Pasteurella multocida*); se tiene un conocimiento mayor de su comportamiento ya sea de defensa al medio ambiente, a los desinfectantes y los antibióticos.
- ✓ Los usos y manejo de microorganismos en un laboratorio de microbiología es tan amplio como el universo mismo; se puede imponer que produzcan cierto metabolito, podemos lograr hasta que produzca sustancias que antes no hacia por medio de la genética, se pueden utilizar como materiales básicos para la fabricación de vacunas, bacterinas, medicamentos.
- ✓ Actualmente ya no hay barreras ni imposibles, hemos llegado a la era del mundo microbiológico en el que creo que tenemos mas beneficios, que desventajas al trabajar con ellos, conocerlos mejor cada día y saber que tenemos una línea muy grande a seguir para controlar, proteger, prevenir tantas enfermedades tanto en medicina humana como en veterinaria.

## APENDICE: SOBRE ESPECTROSCOPIA APLICADA

En la actualidad, es innegable tanto para el químico orgánico como para profesionales de áreas afines, el empleo de las diversas técnicas espectroscópicas, metodología útil de primera mano para identificación o caracterización de compuestos orgánicos.

Así, el presente apéndice (Miranda R. et al, 2004) tiene por finalidad introducir a profesionistas de áreas relacionadas con la química orgánica en los aspectos fundamentales de dos de las técnicas espectroscópicas comunes: Espectrofotometría de Absorción Infrarroja (IR) y Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

### ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN INFRARROJA

El análisis por IR se basa en la interacción de las moléculas con energía infrarroja. Para entender la forma de esta interacción, es necesario examinar la naturaleza de la energía radiante correspondiente al espectro electromagnético, el cual está constituido por un conjunto de diferentes tipos de radiaciones (luz visible, rayos X, microondas, ondas de radio, entre otras), (figura 1A.) Siendo algunos de sus usos los que a continuación se muestran:

- Identificación de grupos funcionales en un compuesto orgánico.
- Confirma la identidad de un compuesto por comparación con el espectro de una muestra conocida.

La radiación electromagnética presenta un doble comportamiento, en ocasiones tiene propiedades de una partícula (llamada fotón), y en otros se comporta como una onda que viaja a la velocidad de la luz; a su vez las ondas electromagnéticas suelen describirse con base en su longitud ( $\lambda$ ), su amplitud (A) y su frecuencia( $\nu$ ).

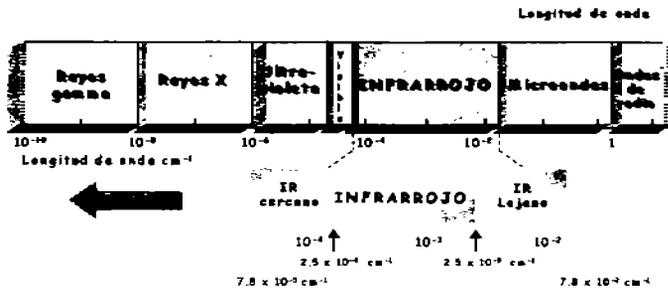


Figura 1\*

En la (figura 2A) se indica una onda donde se describe la longitud de onda ( $\lambda$ ) que es simplemente la distancia de un ciclo completo de la onda; la amplitud de la onda ( $A$ ), y la frecuencia ( $\nu$ ) es el número de ciclos de la onda que pasan por un punto en cierta unidad de tiempo.

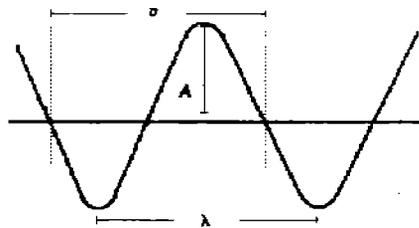


Figura 2A

Así, la energía electromagnética se transmite sólo en paquetes discretos de energía (cuantos). La cantidad de energía que corresponde a un cuanto, es decir de un fotón para una frecuencia dada se evalúa mediante la (ecuación E1A):

$$E = h \nu = h c / \lambda$$

(Ecuación E1A)

$E$  = Energía de un fotón o cuanto (Joules)

$h$  = Constante de Planck ( $6.62 \times 10^{-34}$  J)

$\nu$  = Frecuencia (Hertz)

$c$  = Velocidad de la luz ( $3 \times 10^{10}$  cm/s)

$\lambda$  = Longitud de onda (centímetros)

## Regiones de infrarrojo

La región del infrarrojo dentro del espectro electromagnético cubre el intervalo que queda justo por debajo del visible ( $7.8 \times 10^5 - 7.8 \times 10^2 \text{ cm}^{-1}$ ); sin embargo, solo la región central desde  $2.5 \times 10^3$  a  $2.5 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ , reviste interés para el químico orgánico. Las longitudes de onda específicas dentro de la región IR suelen expresarse en micrómetros ( $1\mu = 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ), y las frecuencias, en función del número de onda ( $f = 1/\nu$ ).

Dado que un compuesto gana energía cuando absorbe radiación, ésta debe distribuirse en la molécula de algún modo, por ejemplo, puede dar por resultado un incremento de los movimientos moleculares, haciendo que los enlaces se alarguen, flexionen o giren (figura 3A); esto considerando un modelo de resorte, (figura 4A.)

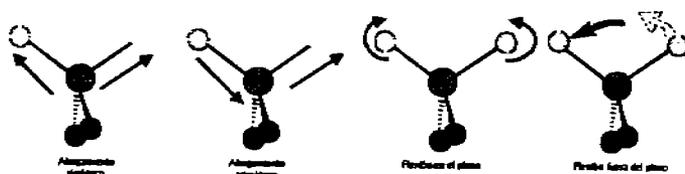


Figura 3A.

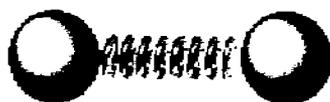


Figura 4A. modelo de dos átomos unidos mediante un resorte.

Así, cuando a un producto orgánico se le hace incidir radiación electromagnética infrarroja, el enlace en vibración absorbe energía radiante si las frecuencias de la radiación y de la vibración son iguales.

En consecuencia, cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración molecular aumenta en intensidad, por lo que cada frecuencia de luz absorbida por una

molécula corresponde a la vibración de un enlace específico (grupo funcional). Debido a lo anterior, puede verse que tipo de vibraciones moleculares presenta una muestra determinando la absorción cuantizada mediante un espectro de infrarrojo; éste consiste de bandas y no de líneas, debido a que los cambios de energía vibracional simple van acompañados de varios cambios de energía rotacional. Particularmente, estas bandas de energía vibracional-rotacional (de 4000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) son de interés analítico para los químicos.

Un espectro de infrarrojo (figura 5A) suele ser una gráfica de radiación transmitida vs longitud de onda; en éste, la frecuencia o la longitud de onda de la absorción depende de las masas relativas de los átomos, de las constantes de fuerza de los enlaces y de la geometría de los átomos. Asimismo, la radiación transmitida o absorbida se expresa mediante la transmitancia (T) o la absorbancia (A) respectivamente, dando lugar a diversas intensidades de las bandas.

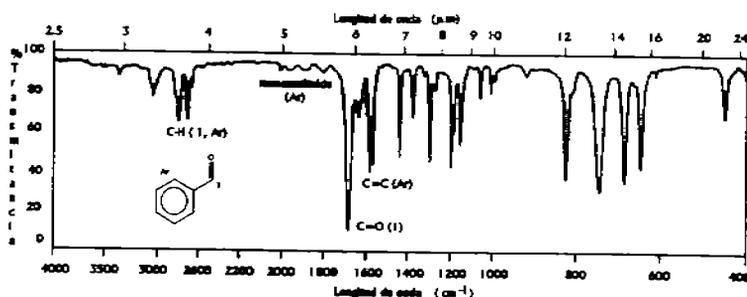


Figura 5A. Espectro de ir para el benzaldehído.

#### Bases de interpretación de un espectro de IR.

Al respecto, no existen reglas rígidas para la interpretación de este tipo de espectros; sin embargo, hay ciertos requisitos que deben satisfacerse antes de intentar una interpretación de los mismos.

Por fortuna, no es necesario interpretar por completo un espectro de infrarrojo para obtener información útil sobre la estructura. La mayoría de los grupos funcionales provocan absorciones características en el infrarrojo que cambian poco de un compuesto a otro. Si se aprende a reconocer en donde se presentan las absorciones características de los grupos funcionales (tabla T1A), es posible obtener información valiosa sobre la estructura a partir de los espectros de infrarrojo.

Para recordar fácilmente la posición de absorciones específicas en el IR, es útil dividir en cuatro partes la región del infrarrojo comprendida entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ , como se muestra en la (figura 6A.)

1. La región de 4000 a 2500  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a las absorciones debidas a los movimientos de estiramiento de los enlaces sencillos (N-H, C-H y O-H). Los enlaces (N-H y O-H) absorben en el intervalo de 3300 a 3600  $\text{cm}^{-1}$ .
2. En la región de 2500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  ocurre el estiramiento del triple enlace. Tanto los nitrilos como los alquinos presentan bandas en esta región.
3. En la región de 2000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  absorben los enlaces dobles de todo tipo (C=O, C=N y C=C); por otro lado, los grupos carbonilo generalmente absorben en el intervalo de 1670 a 1780  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que el estiramiento de los alquenos suele presentarse en un intervalo estrecho entre 1640 y 1680  $\text{cm}^{-1}$ .
4. Por último la zona por debajo de los 1500  $\text{cm}^{-1}$  se conoce como la región de las huellas dactilares, en ésta se presenta un gran número de absorciones debidas a las vibraciones de enlaces sencillos (C-C, C-O, C-N).

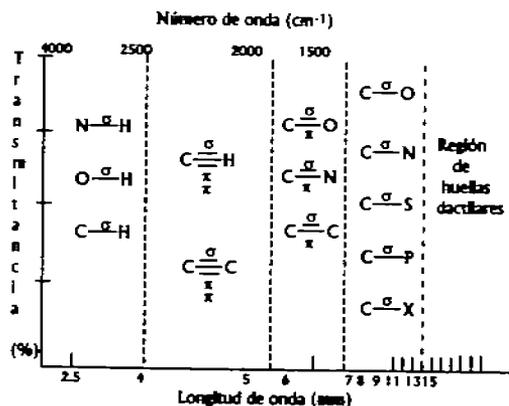
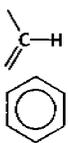


Figura 6A. Regiones del espectro de infrarrojo.

Tabla T1A. Absorciones características en el infrarrojo de algunos grupos funcionales.

Funcionalidad	Posición de la banda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad de absorción
Alcanos C—H	2850-2960	Media a alta
Alquenos =C—H —C=C—	3020-3100 1650-1670	Media Media
Alquinos ≡C—H —C≡C—	3300 2100-2260	Alta Media
Halogenuros de alquilo C—Cl C—Br C—I	600-800 500-600 500	Alta Alta Alta
Alcoholes O—H	3400-3640	Alta y ancha
Eteres C—O—C	1050-1150	Alta

TABLA \_ (Continuación).

Funcionalidad	Posición de la banda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad de absorción
Compuestos Aromáticos 	3030  1600-1500 900-650	Alta  Aguda media
Aminas N—H C—N	3310-3500  1030-1230	Media  Media
Compuestos carbonílicos * C=O	1670-1780	Alta
Ácidos carboxílicos O—H	2500-3100	Alta y muy ancha
Nitrilos C≡N	2210-2260	Media
Compuestos nitro NO <sub>2</sub>	1540	Alta

\* Ácidos, ésteres, aldehídos y cetonas.

## ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La resonancia magnética nuclear (RMN) representa básicamente otra forma de espectroscopia de absorción; bajo condiciones adecuadas, una muestra generalmente orgánica suele absorber radiación electromagnética, específicamente ondas de radiofrecuencia, mediante ciertos núcleos que componen a las moléculas orgánicas, sobre todo de manera particular cuando éstas están dentro de un campo magnético intenso. Subjetivamente esta herramienta suele proporcionar como información una radiografía molecular carbono-hidrógeno. Siendo algunos de sus usos los siguientes aquí mencionados:

- Determinación de la estructura molecular de compuestos orgánicos.
- Realización de análisis cuantitativos.
- Permite plantear un sistema de  $n$  ecuaciones simultáneas de las que se obtienen las fracciones en peso de los componentes de una mezcla.
- Análisis de trazas de un componente.
- Dinámica molecular.

### Origen de la RMN

Históricamente la RMN se empleó para estudiar a los protones (núcleos de los átomos de hidrógeno), de tal manera que inclusive en la actualidad el espectroscopio de RMN de protones es el más común. Por otro lado, mediante esta técnica también se estudia otra variedad de núcleos, tales como el  $^{11}\text{B}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ , y  $^{31}\text{P}$  entre otros. En este momento se hace necesario mencionar que los núcleos de hidrógeno y carbono 13 no son los más útiles para los químicos orgánicos, dado que tales elementos son los componentes principales de las moléculas orgánicas. De lo anterior se entiende que con el término resonancia magnética nuclear se quiere decir comúnmente resonancia magnética de protones o carbono 13, a menos que se especifique otro núcleo.

Un espectrómetro de RMN somete a la muestra orgánica a un intenso campo magnético que hace que los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la molécula se alineen a éste, en una de dos orientaciones posibles para luego ser irradiadas con la energía del orden de la radiofrecuencia.

El espectrómetro de resonancia magnética nuclear (Figura 7A) suele estar equipado para hacer variar el campo magnético y mantener constante la radio frecuencia, al variar

---

\* Es necesario tener presente que en sus inicios la RMN implicaba un claro proceso de absorción (mediante equipos de onda continua) y que en la actualidad se hacen mediciones, por adquisición fundamentada en pulsos (TF).

el valor de  $H_0$  y graficar como función de la cantidad de energía que se absorbe adquiriéndose una representación gráfica llamada espectro de resonancia magnética nuclear. (figura 8A.)

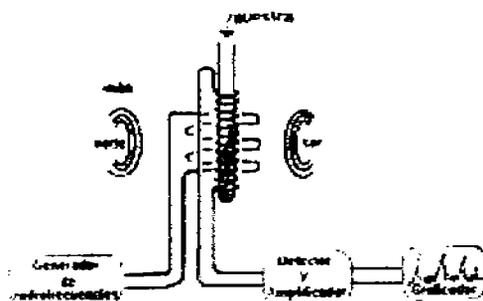


Figura 7A. Diagrama de un espectrómetro de RMN.

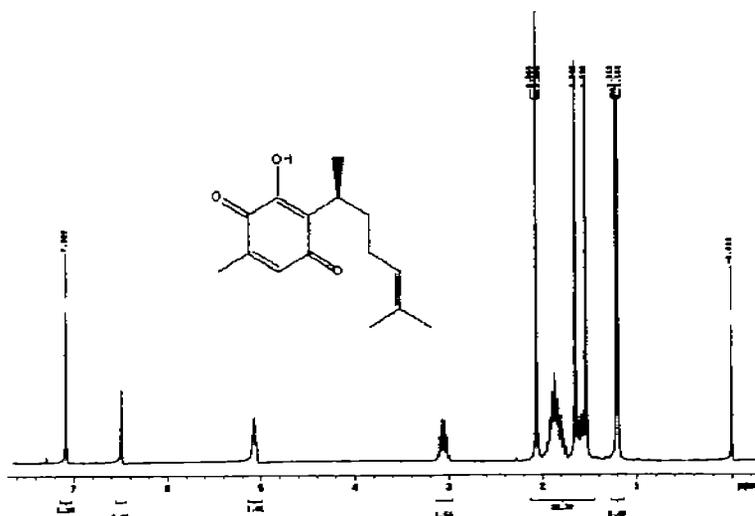


Figura 8A. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la perexona, determinado a 300 MHz ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ).<sup>\*</sup>

## FUNDAMENTO DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los núcleos de los átomos de todos los elementos pueden ser clasificados en núcleos con spin (o giro) y núcleos sin spin. Un núcleo con spin, da lugar a un pequeño campo

\* La Perexona, es el primer metabolito secundario aislado en el "asewo mudo" por Leopoldo Río de la Loza (1852); ésta ha sido objeto de numerosos estudios. Su estructura fue deducida fehacientemente en 1965 con el uso de la RMN.

magnético, que se representa por un vector llamado momento magnético nuclear ( $H$ ) y es semejante al campo de un pequeño imán (figura 9A).



Figura 9A.

En la espectroscopia de RMN, se aplica un campo magnético externo, mediante un imán permanente. La intensidad de este campo magnético se representa por el símbolo  $H_0$  y su dirección mediante una flecha. Así por ejemplo, en un protón que gira su momento magnético nuclear es similar en varios aspectos a una pequeña barra magnetizada; si se coloca en el campo magnético externo el momento magnético de los núcleos de hidrógeno o protones, estos giran para alinearse ya sea con el campo externo, o en contra de él, llegando a un estado de menor energía. Esto ocurre cuando el protón se alinea en el mismo sentido al campo magnético y se le conoce como estado de spin  $\alpha$ .

Por otro lado, el estado de mayor energía, donde el protón está alineado en sentido opuesto al campo magnético externo se le denomina estado de spin  $\beta$ . Los momentos magnéticos de los protones presentan orientaciones al azar, cuando no se aplica ningún campo magnético, por lo que al aplicar un campo magnético, cada protón en una muestra puede asumir el estado  $\alpha$  o el estado  $\beta$  (figura 10A). En un campo magnético fuerte, la diferencia de energía entre ambos estados de spin es mayor que en un campo débil.

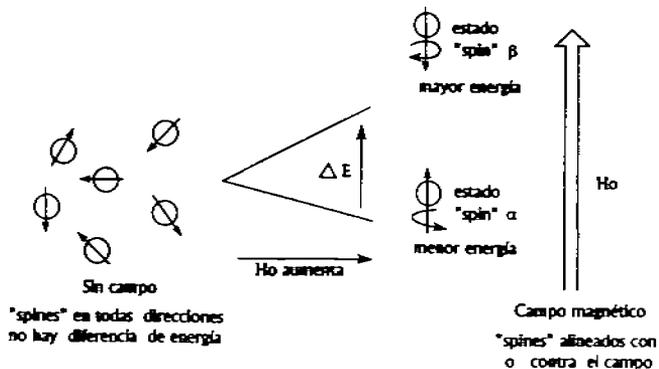


Figura 10A.

Cuando un protón interacciona con un fotón con la energía electromagnética precisa, el spin del protón puede cambiar del estado  $\alpha$  al  $\beta$  o viceversa (Figura 11A). Si el núcleo se sujeta a la combinación correcta de campo magnético y de radio frecuencia, se provoca la inversión del spin de el núcleo, y se dice entonces que está en resonancia, y su energía de absorción se manifiesta como un espectro de RMN.

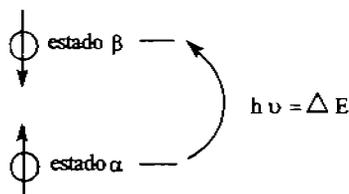


Figura 11A. Representación esquemática del fenómeno de RMN.

Hasta aquí se ha descrito solamente la resonancia de protón o protones aislados en un campo magnético; pero los protones reales en los compuestos orgánicos no están aislados, sino que se encuentran rodeados de diferentes densidades electrónicas (ambiente químico o magnético) generándose diversos campos magnéticos inducidos que se pueden o no oponer al campo externo aplicado, protegiéndolos (no se opone) o desprotegiéndolos (se opone) parcialmente (figura 12A).

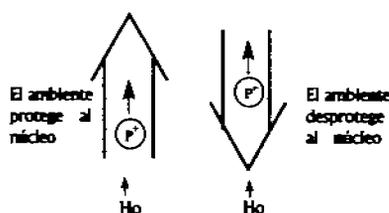


Figura 12A. Notación gráfica de los fenómenos de protección y desprotección de núcleos de hidrógenos por la presencia de grupos electrodonadores y electroattractores respectivamente.

Un espectro de RMN típico (Figura 13A) representa en el eje de las Y la absorción de energía expresada en abundancia relativa vs el eje de las X que representa el



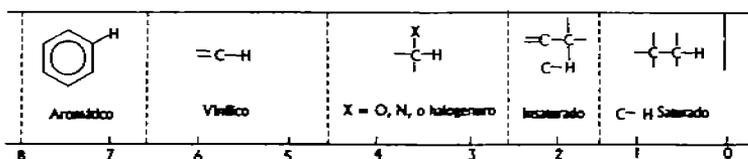


Figura 14A. Desplazamientos químicos para diferentes tipos de protones.

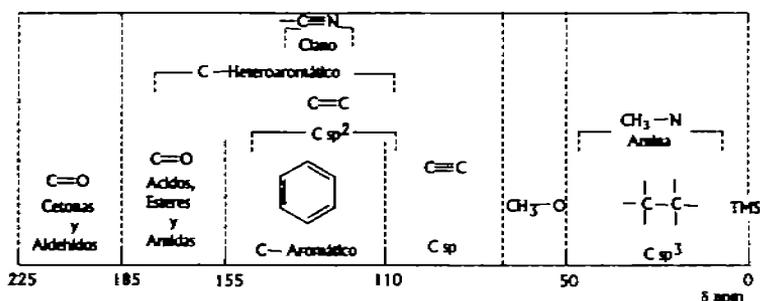


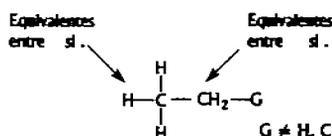
Figura 15A. Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  para algunos grupos funcionales comunes.

En la práctica, es difícil medir con suficiente exactitud el campo magnético al que un núcleo absorbe para así distinguir núcleos individuales, por lo que para tener mediciones cuantitativas, se requiere de un punto de referencia siendo el más empleado el TMS (Tetrametilsilano) situado por convención a 0 ppm, con respecto a los cuales se expresan los desplazamientos químicos de una muestra, estos se representan en valores de  $\delta$ , que significan partes por millón (ppm) de la radio frecuencia aplicada (ecuación E2A).

$$\text{Desplazamiento químico en ppm } (\delta) = \frac{\text{desplazamiento químico del TMS en Hz}}{\text{frecuencia del espectroscopio en Hz}} \quad (\text{Ecuación E2A})$$

Por otro lado, la interpretación de los espectros de RMN es en gran medida empírica, y se basa principalmente en el conocimiento de los desplazamientos químicos característicos para protones en diferentes tipos de combinación estructural. Así, existen

tablas completas reportadas en la literatura en las que se indican valores típicos de los desplazamientos químicos. Cuando los protones se encuentran en un ambiente magnético idéntico dentro de una molécula, exhiben el mismo desplazamiento químico en un espectro de RMN, se dice entonces que los protones son equivalentes magnéticamente, si los protones se encuentran en ambientes magnéticos distintos, los desplazamientos químicos son distintos y, por tanto, no equivalentes (Figura 16A).



*Figura 16A. Los 3 protones del grupo metilo exhiben el mismo desplazamiento químico por ser equivalentes y absorben a la misma frecuencia en el espectro de RMN. Por otro lado los 2 protones del metileno están desprotegidos con relación a los del metilo y tienen un desplazamiento químico mayor.*

Debido a las estructuras tan complejas de las diversas moléculas orgánicas, los efectos de protección de los electrones en varias posiciones son generalmente distintos. Una medición cuidadosa de las intensidades de campo necesarias para la resonancia de los diversos protones en una molécula nos da dos tipos importantes de información:

- El número de absorciones diferentes implica cuantos tipos diferentes de protones hay.
- La cantidad de protección que muestran esas absorciones, indica con frecuencia el entorno electrónico de cada tipo de protón.
- Las intensidades de las señales implican cuantos protones de cada tipo hay.
- El desdoblamiento de las señales proporciona información acerca de otros protones cercanos.

Cuando se mide el área bajo un pico de absorción en un espectro de RMN, determina el número de protones equivalentes que dan lugar a dicha señal. Si se aumenta la resolución (o sea, la sensibilidad) de un espectro de RMN, los picos se resuelven; esto es, cada uno de los picos se subdivide en un conjunto de picos más estrechos. Este tipo de subdivisión se conoce como acoplamiento spin-spin y es ocasionado por la presencia de protones vecinos (protones en carbonos adyacentes, no equivalentes al protón en cuestión). En general, la multiplicidad (número de señales) de una señal está dada por la regla N+1: si N protones equivalentes desdoblan una señal, la señal se desdobla en N+1 picos. Las áreas relativas de las multiplicidades que resultan están dadas aproximadamente por el renglón correspondiente del triángulo de Pascal (tabla T2A).

**TABLA T2A. Intensidades de picos relativos para multiplicidades simétricas.**

Número de núcleos con que interactúan	Señales	Intensidades relativas
0	1 (Simple)	1
1	2 (Doble)	1 1
2	3 (Triple)	1 2 1
3	4 (Cuádruple)	1 3 3 1
4	5 (Quíntuple)	1 4 6 4 1
5	6 (Séxtuple)	1 5 10 10 5 1
6	7 (Séptuple)	1 6 15 20 15 6 1

A la separación que existe entre las señales de un multiplete se le llama constante de acoplamiento, se presenta entre los protones magnéticamente acoplados y vacía de acuerdo con el ambiente de los protones, así como su composición geométrica mutua (debido a que los protones de acoplamiento son causados por fuerzas internas, la constante de acoplamiento es independiente de la fuerza de  $H_0$ ) que se simboliza

mediante J, y la constante de acoplamiento del desdoblamiento que existe entre Ha y Hb se representa como Jab.

Análogamente en RMN  $^{13}\text{C}$ , la señal de cada carbono se desdobla debido a la interacción con los protones directamente unidos a él, por lo que de la misma manera se aplica la regla N+1, N es el número de átomos de hidrógeno unidos directamente al átomo de carbono en cuestión (figura 17A).

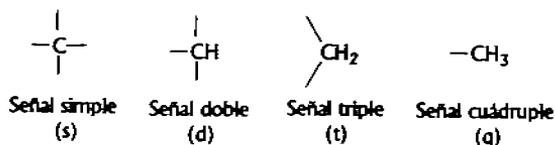


Figura 17A.

El aprendizaje para la interpretación de los espectros de RMN requiere sobre todo, de práctica con un gran número de espectros a los que, con la ayuda de otros datos, se les propondrá una estructura para la sustancia en estudio.

## 7.0 REFERENCIAS

1. Aique, Federico. Manual de Análisis Clínicos 3ª. Edición Editorial Panamericana, Argentina (1975).
2. Altman, *et al.* Structural studies of the capsular polysaccharide from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 4. *Biochem. Cell. Biol.* 66: 998- 1004, (1988).
3. Aguilera E. Desarrollo de una vacuna oral en contra de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 Tesis de Maestría U.N.A.M.- F.E.S. Cuautitlan, (1997).

mediante J, y la constante de acoplamiento del desdoblamiento que existe entre Ha y Hb se representa como Jab.

Análogamente en RMN  $^{13}\text{C}$ , la señal de cada carbono se desdobla debido a la interacción con los protones directamente unidos a él, por lo que de la misma manera se aplica la regla N+1, N es el número de átomos de hidrógeno unidos directamente al átomo de carbono en cuestión (figura 17A).

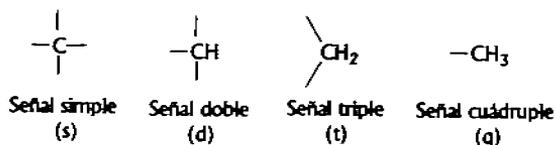


Figura 17A.

El aprendizaje para la interpretación de los espectros de RMN requiere sobre todo, de práctica con un gran número de espectros a los que, con la ayuda de otros datos, se les propondrá una estructura para la sustancia en estudio.

## 7.0 REFERENCIAS

1. Aique, Federico. Manual de Análisis Clínicos 3ª. Edición Editorial Panamericana, Argentina (1975).
2. Altman, *et al.* Structural studies of the capsular polysaccharide from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 4. *Biochem. Cell. Biol.* 66: 998- 1004, (1988).
3. Aguilera E. Desarrollo de una vacuna oral en contra de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 Tesis de Maestría U.N.A.M.- F.E.S. Cuautitlan, (1997).

4. Amass, S. Swine Respiratory Diseases: A Review. The Effect of Wean Age on Pathogen Removal Memorias del VII Día del Porcicultor 1998. Asociación de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en Ciencias Porcícolas del Sur de Sonora, A. C., Navojoa, Sonora, México. Pp 6-20. (1998).
5. Amigot, J.A., Torremorrel, M. and Pijoan, C. Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:169-173,(1998).
6. Badiola S. I. Diferenciación de cepas de *P. multocida* mediante el estudio comparado de sus cinéticas bioquímicas. Universidad Autónoma de Barcelona, (2000).
7. Badiola, S.J.I. y Pujols, R.J.: Estudios sobre la interacción del virus de Aujeszky con *Pasteurella multocida* en los procesos neumónicos del cerdo. Tesis de maestría. Facu. de Est. Sup. Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Izcalli, Edo. de México, (1984).
8. Badiola-Saiz J. L. *et al.* Biological features of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits in the northeast area of Spain. *J. Appl. Rabbit Res.* 15: 1366-1374, (1992).
9. Beyton, *et al.* Characterization of the Lipopolysaccharide O Antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 9 and 11. *J. Bacteriology.* 174 :16, 5324- 5331(1992).
10. Bisgaard M. (1995) Taxonomy of the family Pasteurellaceae Pohl. *Inc: Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella.* W Donachie, F.A. Laison and J.C. Hodgson (Eds.) pp.1-7 Plenum Press, New Cork, USA.( 1981).
11. Biberstein E.L., Jang S.S., Kass P.H. and Hirsh D.C. Distribution of indole-producing urease-negative pasteurellas in animals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 319-323. (1991).
12. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, (1976).
13. Brogden K.A., Rhoades K.R. and Heddleston K.L. A new serotype of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. *Avian Dis.* 22: 185-190 (1978).
14. Caballero, C.S.: Efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de *Pasteurella multocida* en cerdos de engorda. Tesis de maestría. Fac. de Est. Sup.

- Cuautitlan. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. Cuautitlan, Izcalli, Edo. de Mexico, (1985).
15. Calsamiglia, M., Pjoan, C. and Trigo, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Diagn. Invest* 11:246-251 (1999).
  16. Carter G.R. Studies on *Pasteurella multocida* I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*16: 481- 484. (1955).
  17. Carter, G.R. Studies on *Pasteurella multocida* III. A serological survey of bovine and porcine strains from various parts of the world. *Am. J. Vet. Res.* 18:437. (1957).
  18. Carter, G.R. and Rundell, S.N. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using a Staphylococcal Hyaluronidase; *Vet. Rec.* 93:343 (1975).
  19. Carter, G.R. and Subronto, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with Acriflavine; *Am. J. Vet. Res.* 34 (2); 293-294. (1973).
  20. Carter G. R: *Pasteurella*. In: *Bergey's Manual and Systematic Bacteriology*. J.G. Holt and N.R. Kreig (Eds.) 1:552- 557Williams & Wilkings, Baltimore, USA. (1984).
  21. Ciprián et al, 1988; Interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en las neumonías de los cerdos . Tesis Doctoral FESC UNAM.. Ciprián, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., Lopez-Revilla, R. and Garza de la, M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida*. *Can. J. Vet. Res.*, 52: 434-438. (1987).
  22. Ciprián A., Cruz T.A., de la Garza M. *Micoplasma hyopneumoniae*: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. *Arch. Med. Res.* 25: 235-239. (1994).
  23. Ciprián, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., LopezRevilla, R. and Garza de la, M.: *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida*. *Can. J. Vet. Res.*, 52: 434-438 (1988).
  24. Ciprián A, Medina G, Fuentes M, et al. Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Vet Mex* 19:205-210(1988).
  25. Ciprián, A., Colmenares, G. Y Mendoza, S. La Enfermedad en México *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Compendio sobre

- Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Editado por AMVEC, AC. Guadalajara, Jal, México. pp. 29-42. (1990).
26. Ciprián, C.A. Impacto del diagnóstico serológico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en las diferentes prácticas de destete. Memorias Enfermedades Infecciosas en el Cerdo de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en cerdos de los Altos de Jalisco. Enero. Pp. 28-45, (1999).
  27. Ciprián, C.A.; Mendoza, E.S., Cruz, S.T., Colmenares, V.G., Romero, R.A. Sistema rápido para el diagnóstico serológico de App- Hps -Pm -Mh denominado NEUMOTESTmr . (marca registrada unam). Memorias del VIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (ALVEC) y VII Congreso Organismo Iberoamericano de Porcicultura (OIP), Colima, México. (1999).
  28. Colmenares, V., Mendoza, S., Ayala, G., and Ciprián, A. A rapid field serological test for the diagnostic of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society. The Hague, The Netherlands. P, 223. (1992).
  29. Coudert P., Rideaud P. and Balencon M. Pasteurellose non respiratoire en élevage intensif. L'otite moyenne des lapines reproductrices. In: *Proceedings 4<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole*. Paris, 10-11 Diciembre 1986. Communication n° 31. (1986)
  30. Dee, S. A. The porcine respiratory disease complex: are subpopulations important. *Swine Health. Prod.*4: 147-149 (1996).
  31. Dibb W.L. and Digranes A. Characteristics of 20 human *Pasteurella* isolates from animal bite wounds. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]* 89: 137-141. (1981).
  32. DiGiacomo R.F., Garlinghouse L.E. and van Hoosier G.L. Natural history of infection with *Pasteurella multocida* in rabbits. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183: 1172-1175. (1983).
  33. DiGiacomo R.F., Deeb B.J., Giddens W.E., Bernard B.L. and Chengappa M.M. Atrophic rhinitis in New Zealand white rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1460-1465. (1989).
  34. DiGiacomo R.F., Deeb B.J., Brodie S.J., Zimmerman T.E., Veltkamp E.R. and Chrisp C.E. Toxin production by *Pasteurella multocida* isolated from rabbits with atrophic rhinitis. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1280-1286. (1993).

35. Falcon, N.A., Paz de, V.O., Morales, J., Batalla, C.D., Alvarado, A., Sierra, N., Tortora, P.J., Mendoza, A.S., Hernandez, B.E., Camacho, M.J. y Ciprián, C.A.: Sinergia entre el virus de la pseudorrabia (PRV) y *Haemophilus pleuropneumoniae* en la pleuroneumonía contagiosa. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria en México en 1987. P. 8384. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1987).
36. Fenwick, B. and Henry, S. Porcine pleuropneumonia. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 204:1334-1340. (1994).
37. Flatt R.E. and Dungworth D.L. Enzootic pneumonia in rabbits: naturally occurring lesions in lung of apparently healthy young rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 32: 621-626. (1971).
38. Flatt R.E., Deyoung D.W. and Hogle R.M. Suppurative otitis media in the rabbit: prevalence, pathology, and microbiology. *Lab.Anim. Sci.* 27: 343-347. (1977).
39. Frey, J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiol.* 3:257-261. (1995).
40. Galina, L., Molitor, T. And Pijoan, C. Effect of PRRS virus on the clearance of *Streptococcus suis* serotype 2 by pig alveolar macrophages. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. Congress. Bangkok. Thailand.* P. 142. (1994 b).
41. García, G.J., Camacho, M.J., Mendoza, E.S., Ciprián, C.A., González, G.S., Díaz, C. y Stephano, A.H. Infección experimental con el virus del ojo azul y *Pasteurella multocida* en cerdos convencionales. En Memorias del 23 Congreso de la Asoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos, León, (2000).
42. García C.C., Montañez C., Tenorio G.V., Reyes-Esparza J., Duran M.J., Negrete E., Guerrero B.A., and De la Garza M. A 24-kDa cloned Zn-metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin in vitro. *Can. J. Vet. Res.* 64:88-95, (2000).
43. Garibay, J., Mendoza, E.S., Hernández-Baumgarten, E. and Ciprián, C.A. Extracellular appendices in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1,3 and 5 from lungs porcine with contagious pleuropneumonia. *Indian J. of Com. Microbiol. Immunol. And Infect. Dis.* (En prensa, aceptado el 12 de Enero del (2000).

44. Glavits R. and Magyar T. The pathology of experimental respiratory infection with *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in rabbits. *Acta Vet. Hung.* 38: 211-215. (1990)
45. Glorioso J.C., Jones G.W., Rush H.G., Pentler L.J., Darif C.A. and Coward J.E. Adhesiopl of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infect. Immun.* 35: 1103-1109. (1982).
46. Gottschalk, M. Avances recientes en el diagnóstico, tipificación y control de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*. Memorias del VII Día del Porcicultor 1998. Asociación de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en Ciencias Porcícolas del Sur de Sonora, A.C., Navojoa, Sonora, México. Pp 86-98, (1998).
47. Gourlay R.N., Thomas L.H. and Wyld S.G. Experimental *Pasteurella multocida* pneumonia in calves. *Res. Vet. Sci.* 47: 185-189. (1989).
48. Guerrero-Barrera A.L., De la Garza M., Mondragon R., Garcia C.C., and Segura M. Prokaryotic actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 145:3235-3244, (1999).
49. Heddleston K.L., Gallagher L.E. and Rebers P.A. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.* 16: 925-936. (1972).
50. Holmes H.T., Patton N.M. and Cheeke P.R. The incidence of vaginal and nasal *Pasteurella multocida* in commercial rabbitry. *J. Appl. Rabbit Res.* 6: 3585-3593. (1983).
51. Holst E., Rollof J., Larsson L. and Nielsen J.P. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2984-2987. (1992).
52. Jaques, M., Belanger, M., Diarra, M.S., Dargis M., Malouin E. Modulación of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and in vivo. *Microbiol* 140 (Pt 2): 263-270. (1994).

53. Jacques and Froiry. Electrón Microscopio Visualization of Capsular Material of *Pasteurella multocida* Types A y D Labeled with Polycationic Ferritin. *J. Bacteriology*. 169, Nº. 8, 3470-3472(1987).
54. Klein N.C. and Cunha B.A. *Pasteurella multocida* pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* 12: 54-56. (1997).
55. Lambert Joseph, Shurvell Herbert, Lighter David and Cooks Graham. Organic Structural Spectroscopy. Prentice Hall Uppersaddle River, New Jersey First Edition (1998).
56. Lariviere, L. Leblanc, K. R. Mittal,\* and G.-P. Martineau. American Society for Microbiology. Characterization of *Pasteurella multocida* from Nasal Cavities Of Piglets from Farms with or without Atrophic Rhinitis. *Journal of Clinical Microbiology*, June 30:6, , p. 1398-1401(1992).
57. Leikes L. and Corbett M.J. A preliminary study of the transmission of *Pasteurella multocida* in rabbits, *J. Appl. Rabbit Res.* 6: 125-126. (1983).
58. Lichtensteiger, C., Steenberger, S., Lee, R., Polson and Vimr, E. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.* 3035-3039. (1996).
59. Loeffen WLA, Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Vet Rec* 145:123-126, (1999).
60. Lu Y.S., Pakes S.P. and Stefanu C. Capsular and somatic serotypes of *Pasteurella multocida* isolates recovered from healthy and diseased rabbits in Texas. *J. Clin. Microbiol.* 18: 292-295. (1983).
61. Lu Y.S., Pakes S.P. and Nie L.C. A monoclonal antibody against a *Pasteurella multocida* outer membrane protein protects rabbits and mice against pasteurelosis. *Infect. Immun.* 59: 4517-4523. (1991a).
62. Maeda, H. Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbial Immunol* 40:685-699, (1996).
63. Manley, G. Rapid separation of mucopolysaccharides by salt gradient ion-exchange paper chromatography *Nature* 206, 1253, ( 1965).
64. Mendoza E. S. Estudio de las toxinas de *B. bronchiseptica* y *P. multocida* en la patogenia de la rinitis atrofica del cerdo. Tesis de Maestria U.N.A.M.-F.E.S. Cuautitlán (1989).

65. Mendoza, S., Ayala, G., Torres, O., and Ciprián. A. Study of a farma affected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* using the serological test PLEUROTEST MR. Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992. The Hague, The Netherlands. P, 188. (1992).
66. Miranda René, Hernández Eva, García Judith, Aguilera José Luis. Técnicas básicas para la experimentación en química orgánica. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Octubre (2004).
67. Molitor, T. Allen D. Leman Swine Conference. *Pasteurella*. p173. (1997).
68. Morrise J.P. Enquête sur la mortalité dans les élevages bretons. Compte-rendu de la session organisée par l' I.T.A.V.L., Ploufrang, 14 novembre 1979. (1979).
69. Morrison RB, Pijoan C, Hilley HD , Rapp V. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J Comp Med.* 49:129-137(1985).
70. M. Vasfi Marandi and K. R. Mittal\*Identification and Characterization of Outer Membrane Proteins of *Pasteurella multocida* Serotype D by Using Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 4, Apr., p. 952-957 . (1995).
71. Negrete Abascal E., Tenorio V., Reyes M., García R.M., Guerrero A.L., and De la Garza M. Purification of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. An antigen expressed by all the serotypes, and detected in pigs with pleuropneumonia. *Can. J. Vet. Res.* 62: 183-190. 1999. Negrete A. E., Tenorio G.V., and De la Garza M. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Curr. Microbiol.* 38: 64-67. (1998).
72. Okerman L. Diseases of the respiratory and cardiovascular systems. In: *Diseases of domestic rabbits*. Pp. 65-70. Blackwell Sci. Pub. London. UK. (1994)
73. Pandit, K.K. Capsular hyaluronic acid in *Pasteurella multocida* type A and its counterpart in type D. *Res. Vet. Sc.* 54: 20- 24(1993).
74. Paul L. DeAngelis,a,\* Nur Sibel Gunay,b Toshihiko Toida,c Wen-jun Mao,bRobert J. Linhardt. Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F. *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin,Respectively a) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oklahoma Center for Medical Glycobiology,University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK 73104, USA b)Departments of Chemistry, Medicinal and Natural Products Chemistry, and Chemical and Biochemical Engineering, University of Iowa,Iowa City, IA 52242, USA. c)

Department of Bioanalytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba 263- 8522, Japan Received 14 May 2002; accepted 18 July (2002).

75. Percy D.H., Prescott J.F. and Bhasin J.I. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits in Canada. *Can. J. Comp. Med.* 48: 162-165. (1984).
76. Piffer IA, Ross RF. Effect of age on suseptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae pneumonia*. *Am J Vet Res* 45:478-481(1984).
77. Pijoan, C. and Ochoa, G.: Interaction between a hog cholera vaccine strain *Pasteurella multocida* in the production of porcine pneumonia. *J. comp. Path.*, 88: 167-170 (1978).
78. Piojan C. and Trigo F. Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. *Can. J. Vet. Res.* 54 Suppl: S16-S21(1990).
79. Pijoan, C y Trigo, F. *Pasteurella*. En: *Enfermedades de los Cerdos*; Edit. R.R. Necochecha y C. Pijoan Aguade. Ed. México; p. 327-333. ( 1986).
80. Pijoan, C. Neumonía del cerdo. En *encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo*. Editado por Correa, G. P. y Morilla, G. A.; Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos ( AMVEC). P. 85-99. (1985).
81. Piojan 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).
82. Purdy C.W., Raleigh R.H., Collins J.K., Watts J.L. and Straus D.C. Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. *Curr. Microbiol.* 34: 260-266. (1997).
83. Rebers P.A., Jensen A.E. and Laird G.A. Expresion of pili and capsule by the avian strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis.* 32: 313-318. (1988).
84. Redondo E., Masot A.J., *et al.*, Experimental reproduction of acute pneumonic pasteurelosis in rabbits. *Histol.Histopathol.* 8: 97-104. (1993).
85. Rhoades K.R. and Rimler R.B. *Pasteurella multocida* colonization and invasion in experimentally exposed turkey poults. *Avian Dis.* 34:381-383. (1981).

86. Rhoades K.R., Rimler R.B. and Bagley R.A. Fowl cholera epornitic: antigenic characterization and virulence of selected *Pasteurella multocida* isolates. *Avian Dis.* 36: 84-87. (1992).
87. Rimler R.B. and Rhoades K.R. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 698-705. (1997).
88. Roberts, R.S. An immunological study of *Pasteurella septica*; *J. of Comp. Path.* 57:261-278. (1947).
89. Sebunya TNK, Saunders JR. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *JAVMA* 182:1331-1336(1983).
90. Serrano-Luna JJ., Negrete A.E., Reyes M., and De la Garza M. Entamoeba histolytica. HM1-IMSS Hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Experimental Parasitology.* 89:71-77.(1988).
91. Shewen P. *EPasteurella*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. C. L. Gyles y C.O. Thoen (Eds.) pp. 147- 153. Iowa State University Press, USA. (1986).
92. Smith IM, Hodges RT, Betts AO, Hayward AHS. Experimental infections of gnotobiotic piglets with *Pasteurella septica* (sero-group A) alone or with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Path* 83:307-321(1973).
93. Spanoghe L. Etiologie en preventie van Pasteurellose bij konijnen. *Mededelingen van de Faculteit Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit Gent (Belgium).* (1984).
94. Suckow M.A., Bowersock T.L., Nielsen K., Chrisp C.E., Frandsen P.L. and Janovitz E.B. Protective immunity to *Pasteurella multocida* heat-labile toxin by intranasal immunization in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 45: 526-532. (1995).
95. Tenorio, G.V., Falcón, N.A., Ciprián, C.A. y Camacho, M.J. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria en México. Pp, 9. SARH UNAM. México, D.F. (1987).
96. Tenorio, G.V. Tesis de Doctorado, FES-Cuautitlán, UNAM, (1997).
97. Torres, O., Mendoza, S., Ayala, G., and Ciprián, A. Serological diagnostic with PLEUROTTEST MR and microbiological study of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in samples collected at slaughterhouse. Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992. The Hague, The Netherlands. P, 224. (1992).
98. Torres., M.E., Mendoza, E.S., Tórtora, P.J., Correa, G.P., Lara, H.J.P. Flores, L., García, R. Y Ciprián, C.A. Efecto del Paramyxovirus porcino en la presentación

- de la pleuropneumonia contagiosa porcina producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Memorias del XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. (AMVEC). Veracruz, Ver. Pag. 65. (1996).
99. Torremorell, M. Ph.D. Thesis. University of Minnesota. (1999).
100. Townsend K.M., O'Boyle D., *et al.* Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Vet. Microbiol.* 63: 205-215. (1998).
101. Unchitti K., Wongsawang S., Saitanu K. and Thoongsuwan S. Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from humans, swine and poultry in Thailand. *SoutheastAsian J. Trop. Med. Public Health* 23: 520-525.(1992).
102. Utrera, V. and Pijoan, C. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tract. *Vet. Rec.* 128:357-358. (1991).
103. Wine N., Lim Y. and Fierer J. *Pasteurella multocida* epiglottitis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 123: 759-761. (1997).
104. Zollner N. y Kirsch, K, Determinaciones de la concentración de Lípidos totales en sueros. *Med.* 135, 545. (1962).

