La microbiota nasal y la enfermedad de Glässer

VIRGINIA ARAGÓN
IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona.

RESUMEN

La microbiota es el conjunto de microorganismos que colonizan de manera natural las superficies del cuerpo de individuos sanos, y constituye una barrera natural a la entrada de patógenos. Una alta diversidad en la microbiota se asocia con la salud de los individuos. La microbiota nasal tiene características comunes con la microbiota de otras partes del cuerpo, con los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* como grupos predominantes. A nivel de géneros bacterianos se hacen evidentes las diferencias entre las microbiotas, pero hay bacterias que pueden ser consideradas marcadores generales de salud, como *Lactobacillus* o *Bacteroides*, que se encuentran en las microbiotas de zonas tan distintas como el intestino y la cavidad nasal. Los análisis de la composición de la microbiota mediante secuenciación proporcionan gran cantidad de datos, pero necesitan ser complementados con la caracterización de las cepas específicas de cada grupo bacteriano detectado.

Palabras clave: microbiota nasal; enfermedad de Glässer; diversidad bacteriana; colonización nasal.

MICROBIOTA

La microbiota normal, antes llamada flora normal, es el conjunto de microorganismos que encontramos de manera natural en distintos sitios del cuerpo de individuos sanos. Aunque microbiota hay en muchas partes de los organismos, la microbiota intestinal es la que ha sido más ampliamente estudiada, sobre todo en relación a su efecto tanto nutricional como de estimulación del sistema inmune y protección frente a patógenos. Uno de los aspectos que se estudian habitualmente es la diversidad de la comunidad bacteriana que compone la microbiota.

La diversidad mide cuántas bacterias diferentes componen la microbiota. Una diversidad alta de la microbiota intestinal se asocia a un estado saludable, mientras que una baja diversidad se considera un marcador de disbiosis o desequilibrio microbiano encontrándose en personas con diversas enfermedades (*Valdés et al., 2018*).

La microbiota constituye una barrera natural a la colonización y entrada de patógenos, pero no solo a nivel digestivo sino también en otras partes del cuerpo. En el ámbito de las enfermedades respiratorias, la microbiota de la cavidad nasal adquiere una clara importancia ya que ésta es la vía de entrada de estos patógenos. Además, la colonización del tracto respiratorio superior constituye frecuentemente un primer paso en la patogenia de las enfermedades respiratorias. La cavidad nasal de los lechones comienza a colonizarse con bacterias durante el nacimiento, y la

composición de esta comunidad de colonizadores se va modificando a través del contacto con el ambiente y las madres hasta alcanzar una composición estable. Así, en las granjas, las madres representan una fuente no sólo de patógenos (aspecto ampliamente estudiado en el control de enfermedades), sino también de bacterias beneficiosas de la microbiota. Estas últimas han adquirido interés científico más recientemente.

MICROBIOTA NASAL

La microbiota nasal porcina tiene componentes bacterianos comunes con la microbiota de otras zonas del cuerpo, pero también bacterias más específicas. Los tres grupos bacterianos mayoritarios en la microbiota nasal de los lechones son los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, que representan más del 90% del total de bacterias presentes (*Correa-Fiz et al., 2016*). De forma similar, estostres taxones son también los predominantes en la microbiota intestinal (*Yang et al., 2019*) y en la orofaríngea (*Wang et al., 2018*).

Estas similitudes desaparecen cuando se caracteriza la composición de la microbiota con más detalle, a nivel de género bacteriano. En la microbiota nasal los géneros bacterianos más abundantes en los lechones sanos al destete son *Moraxella* y *Bergeyella* (*Correa-Fiz et al., 2016; Figura 1*), seguidos de *Streptococcus*, *Haemophilus (Glasserella)* y *Prevotella*. Estas bacterias, excepto *Streptococcus* y *Prevotella*, no se encuentran en la microbiota intestinal de los lechones.

Algunas de las bacterias propias de la microbiota nasal, como *Glaesserella (Haemophilus) parasuis*, son colonizadores tempranos del tracto respiratorio superior. *G. parasuis* coloniza la cavidad nasal de los lechones en los primeros días tras el nacimiento, pero en determinadas circunstancias las cepas virulentas son capaces de producir enfermedad. Como colonizador, *G. parasuis* se puede aislar de la cavidad nasal de lechones sanos, formando parte de la microbiota nasal. Como patógeno, las cepas virulentas de *G. parasuis* son causantes de poliserositis fibrinosa en la fase posdestete, la dolencia conocida como enfermedad de Glässer. En su vertiente patógena, las cepas virulentas de *G. parasuis* se enfrentan a la microbiota nasal como una de las primeras barreras que tienen que superar durante el proceso de infección. Tras la colonización inicial del tracto respiratorio superior, principalmente la cavidad nasal, las cepas virulentas resisten la inmunidad nativa y sobreviven tanto en el pulmón como en el torrente sanguíneo para llegar a invadir órganos sistémicos donde producen las lesiones típicas de la enfermedad.

Uno de los factores que más afectan la composición de la microbiota es el uso de antibióticos. El control de las enfermedades causadas por colonizadores tempranos, como es *G. parasuis*, se realiza a menudo mediante tratamientos antimicrobianos perinatales. Aunque es verdad que en los primeros momentos los antibióticos perinatales pueden disminuir la carga bacteriana de patógenos, también afectan a las bacterias beneficiosas de la microbiota, provocando en muchos casos una disminución de la diversidad bacteriana. Esta disminución de la diversidad bacteriana en la microbiota puede a su vez incrementar la predisposición del lechón a sufrir enfermedades. De hecho, se ha observado que la eliminación de la administración de *ceftiofur* cristalino en los primeros días de vida de los lechones supone un aumento de la diversidad de la microbiota. Aunque este aumento en la diversidad de la microbiota era esperable al eliminar el antibiótico, cabe destacar que esta mejora en la diversidad fue acompañada de una disminución de la mortalidad y de los casos clínicos de poliserositis en la transición, asociando el aumento de diversidad microbiana con una mejora de la salud de los lechones (*Correa-Fiz et al., 2019*).

Los tratamientos antimicrobianos además pueden favorecer la aparición de resistencias, e incluso en el caso de la enfermedad de Glässer. También se ha observado que los tratamientos antibióticos en el momento de la colonización por *G. parasuis,* inhiben la respuesta inmune frente a la bacteria (posiblemente por la reducción en la carga bacteriana), dejando a los lechones desprotegidos (*Macedo et al., 2017*). En conjunto, cabe recalcar la prudencia que debe haber en el uso de los antimicrobianos, evitando su uso de forma metafiláctica, sobre todo en los lechones recién nacidos que necesitan colonizarse correctamente para su protección y la correcta maduración del sistema inmune.

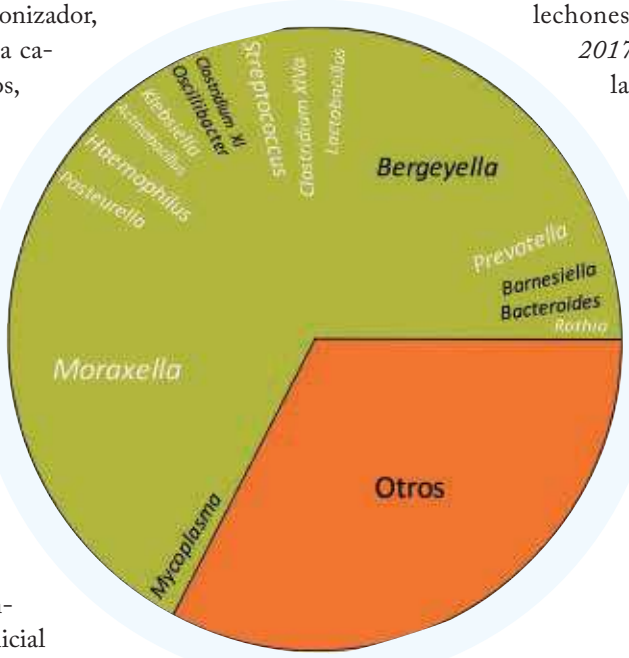

FIGURA 1

Composición de la microbiota nasal de lechones sanos de 3-4 semanas de vida.

EL PAPEL DE LA MICROBIOTA NASAL EN LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER

Los anticuerpos juegan un papel esencial en el control de la enfermedad de Glässer, ya que facilitan la opsonización y el reconocimiento por el sistema inmune de las cepas virulentas de *G. parasuis*, con el consiguiente control de la infección. Sin embargo, no se puede entender completamente el control de esta enfermedad sin estudiar el papel de la respuesta inmune nativa y el de la microbiota nasal.

Como se ha mencionado anteriormente, la microbiota de la cavidad nasal es la primera barrera a la infección y, junto con la respuesta inmune, es clave para establecer un equilibrio con el huésped. El destete es un momento de estrés y grandes cambios para los lechones, que pueden alterar este equilibrio. La respuesta inmune nativa, como la acción bactericida del complemento del suero o la fagocitosis de los macrófagos alveolares, no es capaz de controlar las cepas virulentas de *G. parasuis*, pero sí las cepas no-virulentas. De este modo, las cepas no-virulentas de *G. parasuis* son retenidas en la cavidad nasal, donde forman parte de la microbiota, y junto al resto de las bacterias de la misma, juegan un papel importante en el control de la enfermedad de Glässer. De hecho, la composición de la microbiota nasal en el momento del destete juega un papel importante en el desarrollo de las poliserositis en transición. Aunque el mecanismo no se ha estudiado todavía, es probable que exista un mecanismo de exclusión competitiva de las cepas patógenas, así como una estimulación del sistema inmune por parte de la microbiota. Es esperable que el papel de la microbiota nasal no sea específico para la enfermedad de Glässer, sino que podría intervenir en el control de múltiples enfermedades de origen respiratorio.

La microbiota puede considerarse una fuente de bacterias beneficiosas, pero en su composición pueden encontrarse también posibles patógenos. Con el fin de determinar qué bacterias podrían ser beneficiosas para la salud de los lechones y el control de la enfermedad de Glässer, se realizaron comparaciones entre la microbiota nasal de lechones sanos frentes a la de aquellos que sufrían la enfermedad. En el momento del destete, la diversidad de la microbiota nasal de los animales que posteriormente sufrían la enfermedad de Glässer era menor que la de aquellos que permanecía sanos en la transición (*Correa-Fiz et al., 2016; Figura 2*), confirmando una vez más que una alta diversidad está asociada con la salud. Los lechones que desarrollaban la enfermedad de Glässer en la transición presentaban cambios en la microbiota nasal al destete que se caracterizaban por un aumento del *filum Proteobacteria* y una disminución del *filum Firmicutes* (*Correa-Fiz et al., 2017*).

A nivel de género, la composición se veía afectada con un aumento de *Bergeyella*, *Streptococcus*, *Glasserella*, *Moraxella* y *Mycoplasma,* y la disminución de la abundancia relativa de *Bacteroides*, *Lactobacillus* y *Prevotella* en los lechones que enfermaban (*Correa-Fiz et al., 2016*). Algunas de estas observaciones se han confirmado en estudios de la microbiota orofaríngea en relación con otras enfermedades respiratorias. Así, una mayor abundancia relativa de *Moraxella* en la microbiota orofaríngea se asoció con el desarrollo de enfermedad respiratoria, mientras que *Lactobacillus* parecía tener un papel protectivo (*Wang et al., 2018*). También en el caso de la microbiota intestinal y su relación con el desarrollo de diarreas se observan aspectos comunes, como la asociación de un mayor porcentaje de *Proteobacteria* con la predisposición a sufrir diarrea y la asociación de *Bacteriodes* y *Lactobacillus* con la salud intestinal (*Tan et al., 2019; Yang et al., 2019*).

La comparación de las microbiotas de los lechones sanos respecto a los que desarrollan enfermedades es una herramienta para la identificación de grupos bacterianos relacionados con la salud. Esta información podría ser útil para la posterior caracterización de las bacterias identificadas y su posible aplicación para el control de la enfermedad. Globalmente, las características comunes que se han identificado en la composición de la microbiota de

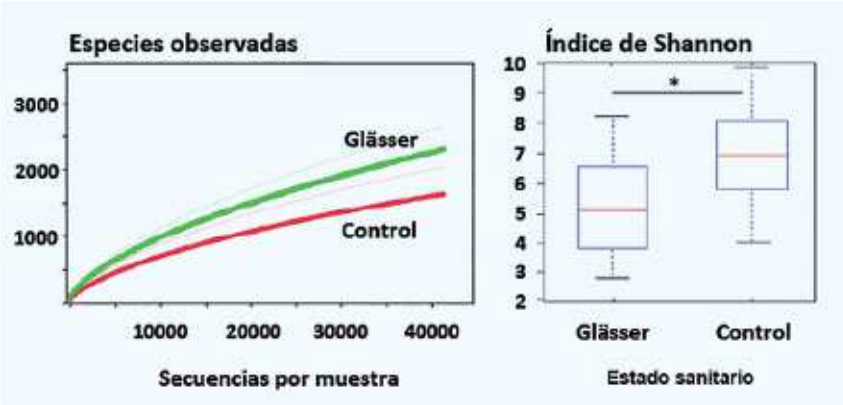

FIGURA 2

Diversidad Alpha medida por el número de taxones observados (gráfica izquierda) y por el índice de Shannon (gráfica derecha) en muestras nasales de lechones al destete provenientes de granjas sanas (control) o granjas con casos de enfermedad de Glässer.

distintos lugares del cuerpo hacen pensar en la relación entre las distintas microbiotas de los lechones y cómo la manipulación de una podría afectar al resto.

LA DEFINICIÓN DE LA MICROBIOTA A NIVEL DE CEPAS

Los análisis más comunes de microbiota se realizan por la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S. Con esta secuencia parcial, la mayoría de las bacterias presentes en la microbiota se identifican a nivel de género y, en algunos casos, a nivel de especie. Sin embargo, no todas las especies dentro de un género, ni todas las cepas dentro de una especie, tienen las mismas propiedades. Hay grupos bacterianos más homogéneos y otros en el que la heterogeneidad se refleja en aspectos muy variados, incluida la virulencia. La presencia de cepas virulentas de un determinado grupo bacteriano en la microbiota tiene unas connotaciones diferentes a la presencia de cepas que carecen de propiedades virulentas de ese mismo grupo bacteriano, ya que las primeras aumentan el riesgo a desarrollar enfermedad. Así, cuando obtenemos la composición de la microbiota a nivel de género (o especie) nos falta mucha información detallada de las capacidades patogénicas y fisiológicas de las cepas específicas ahí presentes.

Uno de los géneros más abundantes de la microbiota nasal de los lechones al destete es *Moraxella* (*Correa-Fiz et al., 2016; Figura 1*). La caracterización de aislados nasales de *Moraxella* de lechones sanos reveló que las cepas de este género pertenecían a varias especies, incluidas *Moraxella porci* y *Moraxella pluranimalium*. Las cepas nasales del género *Moraxella* eran heterogéneas en varias propiedades, incluida la capacidad de adhesión o la resistencia al suero y a la fagocitosis por macrófagos alveolares (*López-Serrano et al., 2020*). Así, se encontraron cepas con distinto potencial patogénico, definido por las pruebas de virulencia *in vitro* mencionadas anteriormente. Aunque se necesita esclarecer el papel patogénico de *Moraxella* en cerdos, cabe esperar que fuese beneficioso evitar la colonización de los lechones con cepas de este género bacteriano que presenten mecanismos de virulencia. Otro grupo de cepas nasales recientemente estudiado ha sido *Bergeyella*, también muy abundante en la microbiota nasal (*Correa-Fiz et al., 2016; Figura 1*). Las cepas de *Bergeyella* aisladas de muestras nasales pertenecían a dos especies diferentes: *Bergeyella zoohelcum* y *Bergeyella porcorum*. Al contrario de *Moraxella*, las cepas de estas dos especies de *Bergeyella* resultaron ser bastante homogéneas, pero las pruebas *in vitro* también detectaron una potencial capacidad patogénica en estas cepas (*Lorenzo de arriba et al., 2018*). De hecho, la abundancia relativa de *Bergeyella* en la microbiota nasal se ha asociado con enfermedad, ya que es uno de los géneros bacterianos que presentó un mayor incremento de abundancia relativa en los lechones que desarrollaban la enfermedad de Glässer.

En el caso concreto de *G. parasuis*, la presencia de cepas virulentas en la microbiota nasal es un factor de riesgo reconocido para el desarrollo de la enfermedad de Glässer, ya que son éstas las que la producen. Por otro lado, las cepas no-virulentas podrían tener una cierta capacidad protectiva frente a la infección posterior con cepas virulentas (*Brockmeier et al., 2013*). Los análisis de microbiota con el fragmento del gen ribosomal 16S indican que la abundancia de *G. parasuis* es mayor en los lechones que posteriormente enferman. Sin embargo, esta información es limitada, ya que esta bacteria es muy heterogénea y contiene cepas con distintos grados de virulencia. De hecho, mediante un modelo matemático se confirmó que son las cepas virulentas las que realmente están asociadas con la enfermedad, como era de esperar. El mismo modelo permitió un análisis detallado de la asociación entre la composición global de la microbiota nasal y la presencia de cepas de *G. parasuis* de distinta virulencia. Se observó que distintos grupos bacterianos de la microbiota nasal están asociados con la presencia de cepas virulentas o no-virulentas en esta microbiota (*Figura 3*). En concreto, algunas bacterias de la microbiota nasal, como *Phascolarctobacterium* (una bacteria que puede producir ácidos grasos de cadena corta), se asociaron con una mayor colonización por cepas no-virulentas de *G. parasuis*. Además, otras bacterias, como *Escherichia* o *Clostridium* XI, se asociaron con una reducción de la colonización por cepas virulentas, con la

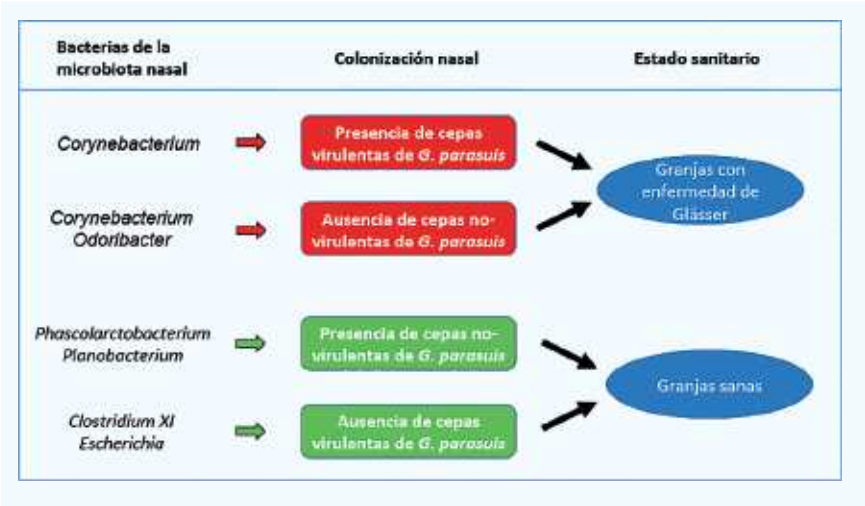

FIGURA 3

La presencia de algunas bacterias en la microbiota nasal está asociada con una mayor o menor colonización nasal por cepas virulentas o no-virulentas de Glaesserella parasuis. La presencia de cepas virulentas y la ausencia de cepas no-virulentas están asociadas con el desarrollo de la enfermedad de Glässer.

consiguiente disminución del riesgo a sufrir la enfermedad de Glässer (*Figura 3*). Estos datos se deberán confirmar con muestras procedentes de un mayor número de granjas, pero indican que las cepas de *G. parasuis*, dependiendo de su virulencia tienen asociaciones y equilibrios distintos con otras bacterias de la microbiota. Es importante conocer estos equilibrios y redes de interacción entre las bacterias de la microbiota para poder predecir posible cambios secundarios a manipulaciones dirigidas a cambiar la composición de esta comunidad bacteriana.

CONCLUSIÓN

El diseño de métodos seguros de manipulación de la microbiota nasal para conseguir una composición óptima, podría tener una clara aplicación en una producción porcina sostenible con un uso limitado de antimicrobianos. Sin embargo, la composición de la microbiota óptima en las distintas localizaciones del cuerpo es difícil de establecer y se deberían ampliar los estudios incluyendo un alto número de individuos y de orígenes diferentes. Además, no está claro hasta qué punto cada especie bacteriana es responsable de la funcionalidad y estabilidad de la microbiota, o es más bien la interacción entre determinados miembros de la microbiota lo que es esencial para sus funciones. Estos aspectos, junto con la relación entre las microbiotas de distintos lugares del cuerpo de los lechones, están todavía sin dilucidar completamente, y podrían abrir nuevas perspectivas en el control de las distintas enfermedades respiratorias porcinas. ■

REFERENCIAS

- Brockmeier SL, Loving CL, Mullins MA, Register KB, Nicholson TL, Wiseman BS, Baker RB, Kehrli ME Jr. Virulence, transmission, and heterologous protection of four isolates of *Haemophilus parasuis*. *Clinical Vaccine Immunology* 2013; 20(9): 1466-72.
- Correa-Fiz F, Fraile L, Aragon V. Piglet nasal microbiota at weaning may influence the development of Glässer's disease during the rearing period. *BMC Genomics* 2016; 17: 404.
- Correa-Fiz F, Gonçalves dos Santos JM, Illas F, Aragon V. Antimicrobial removal on piglets promotes health and higher bacterial diversity in the nasal microbiota. *Scientific Reports* 2019; 9: 6545.
- López-Serrano S, Galofré-Milà N, Costa-Hurtado M, Pérez-de-Rozas AM, Aragon V. Heterogeneity of *Moraxella* isolates found in the nasal cavities of piglets. *BMC Veterinary Research* 2020; 16(1): 28.
- Lorenzo de Arriba M, Lopez-Serrano S, Galofre-Mila N, Aragon V. Characterisation of *Bergeyella* spp. isolated from the nasal cavities of piglets. *The Veterinary Journal* 2018; 234: 1-6.
- Macedo N, Cheeran MC, Rovira A, Holtcamp A, Torremorell M. Effect of enrofloxacin on *Haemophilus parasuis* infection, disease and immune response. *Veterinary Microbiology* 2017; 199: 91-9.
- Mahmmod YS, Correa-Fiz F, AragonV. Variations in association of nasal microbiota with virulent and non-virulent strains of *Glaesserella* (*Haemophilus*) *parasuis* in weaning piglets. *Veterinary Research* 2020; 51: 7.
- Tan Z, Dong W, Ding Y, Ding X, Zhang Q, Jiang L. Porcine Epidemic Diarrhea Altered Colonic Microbiota Communities in Suckling Piglets. *Genes (Basel)* 2019; 11(1): E44.
- Valdés AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018; 361: k2179.
- Wang Q, Cai R, Huang A, Wang X, Qu W, Shi L, Li C, Yan H. Comparison of oropharyngeal microbiota in healthy piglets and piglets with respiratory disease. *Front Microbiology* 2018; 9: 3218.
- Yang Q, Huang X, Wang P, Yan Z, Sun W, Zhao S, Gun S. Longitudinal development of the gut microbiota in healthy and diarrheic piglets induced by age-related dietary changes. *Microbiologyopen* 2019; 8(12): e923.