

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente enfermos de neumonía en la Comarca Lagunera”

POR:

MARÍA GUADALUPE MACHADO RAMOS

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA., MÉXICO

JUNIO DE 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia
haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos
Holstein clínicamente enfermos de neumonía en la
Comarca Lagunera”**

TESIS

APROBADA POR LOS ASESORES

PRESIDENTE DEL JURADO

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**

M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia
haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos
Holstein clínicamente enfermos de neumonía en la
Comarca Lagunera”**

**M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ.
PRESIDENTE**

**M.V.Z. ESEQUIEL CASTILLO ROMERO
VOCAL**

**M.C. MARÍA GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO
VOCAL**

**DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
VOCAL SUPLENTE**

Agradecimientos

A Dios te agradezco infinitamente el darme vida.

A mis padres:

María Esther Ramos Alfaro
Doroteo Machado Medina

Que son mi raíz, ejemplo de amor y tenacidad.
Por su apoyo en todo momento y por encontrarse para así nacer.

A mis hermanos:

María de Jesús Refugio Machado Ramos y Miguel Antonio Machado Ramos,
por llegar a la familia, cada cual en el momento justo, riéndose, con abrazos,
juntos, almohadazos y zarpazos.

A mis Amigos, gracias por su compañía y comprensión.
Lucio, Elsa, Bety, Alma, Sandra, Ramón, Esequiel, Magda, Gerardo y
bienvenidos unos tantos más.

A mi *Alma Terra Mater* : por mi formación como profesionista.

A mis asesores

M. C. Ramón Alfredo González Delgado

M. C. Carlos Julio Jaramillo Arango

Dr. Francisco Aguilar

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber financiado este
proyecto, con clave CONACYT G-38590-B, dirigido por el Dr. Francisco Trigo
Talavera.

Dedicatoria

A mi familia entera que tanto amo
Y sobre todo a mi mejor motivo
Fabio Francisco Arrañaga Machado
Te amo hijo

Resumen

Se realizaron aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, se analizó la frecuencia de presentación de cada bacteria, utilizando muestras nasales con hisopos obtenidos de bovinos Holstein clínicamente enfermos de neumonía en establos lecheros de la Comarca Lagunera.

El estudio fue de tipo descriptivo, prospectivo y transversal y se llevó a cabo de enero-abril 2004 (temporada invierno-primavera), en forma no aleatoria, ya que fue por criterio en 20 hatos tomándose el 100% de los animales enfermos que presentaron neumonía clínica, encontrándose 78 menores de un año. Cabe señalar que la toma de muestras de animales enfermos mayores de un año, no fue posible debido al manejo zootécnico en el cual se estableció el sacrificio de animales enfermos.

El exudado nasal, tomado con hisopos estériles, se transportó en refrigeración en medios de *Stuart* hasta el lugar de trabajo, se sembraron en Agar sangre de carnero y se identificaron con tinción de gram y pruebas bioquímicas.

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico fueron 11 casos positivos, 5 casos de *Pasteurella multocida* y 6 casos *Mannheimia haemolytica*

De acuerdo a los resultados encontrados se manifestó que tanto *Pasteurella multocida* como *Mannheimia haemolytica* son efectivamente aisladas a partir de muestras tomadas en bovinos Holstein clínicamente enfermos de neumonía en la Comarca Lagunera.

Indice de contenido

	Página
Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Resumen	iii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Taxonomía	3
2.2. Morfología bacteriana y de colonia	4
2.3. Especies afectadas	5
2.4. Zoonosis	5
2.5. Lesiones	6
2.6. Patogenia e inmunidad	7
2.7. Factores de virulencia	9
3. Justificación	10
4. Objetivos	11
4.1. Objetivo General	11
4.2. Objetivos Específicos	11
5. Material y Métodos	12
5.1. Marco de Referencia	12
5.2. Toma de muestras	12
6. Resultados	14
7. Discusión	15
8. Conclusiones y sugerencias	16
9. Literatura citada	17
Anexos	23

Indice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Número de unidades productivas y número de bovinos Holstein clínicamente enfermos de neumonía.	13
Cuadro 2. Porcentajes de aislamientos de <i>Pasteurella multocida</i> y <i>Mannheimia haemolytica</i> de bovinos Holstein con neumonía de acuerdo con el número de muestras.	14

1. Introducción

Las enfermedades producen una cascada de efectos sobre la productividad de los animales. El principal efecto directo en la mayoría de las enfermedades se da en el metabolismo de proteínas y en menor grado en el de minerales, vitaminas y energía. Como consecuencia, los animales convierten el alimento menos eficientemente en su propio crecimiento o en productos útiles al humano; además, en el animal enfermo el consumo de alimento tiende a reducirse, lo que exacerba aún más el efecto de la enfermedad (Pijoan y Chávez, 2003).

Las pérdidas económicas por pasteurelisis bovina, comúnmente conocida como fiebre de embarque tienen un costo anual de billones de dólares a la industria ganadera. Aunque la enfermedad de fiebre de embarque es multifactorial, la infección se ve envuelta por una gran variedad de microorganismos en conjunto con el estrés, prácticas de manejo y factores medioambientales (Lafleur *et al.*, 1998).

La pasteurelisis pulmonar bovina (fiebre de embarque) es una enfermedad respiratoria, por lo común fatal, que se desarrolla sobre todo en becerros destetados o en animales menores de un año que se transportan recientemente. (Trigo, 1991) y es uno de los problemas más serios que merman la industria ganadera en Norteamérica (Jaramillo *et al.*, 1987; Sarasola *et al.*, 2002).

Las pérdidas económicas debido a la enfermedad respiratoria bovina esta estimada en un 7% del total de los costos de producción, es la mayor causa de pérdidas económicas y mortalidad en el ganado. (Bisgaard *et al.*, 1991)

Esta enfermedad respiratoria es económicamente significativa del ganado contabilizando aproximadamente el 30% del total de las muertes del ganado

y está asociada con una pérdida anual de un billón de dólares sólo en Norteamérica (Reggie, 2001).

Mannheimia haemolytica serotipo A1 es el principal agente bacterial de la pasteurelosis neumónica bovina, o fiebre de embarque, dando como resultado significantes pérdidas económicas a la industria ganadera (Wang *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Leite *et al.*, 2002; McKerral y Lo, 2002). Esta neumonía fibrinonecrosante multifactorial puede ser desencadenada por infecciones virales, hacinamiento, estrés o inmunosupresión, lo cual permite que la bacteria *Pasteurella*, comensal habitual, tenga acceso al tracto respiratorio bajo, donde se convierte en patógeno (Highlander y Fedorova, 2000).

La patogénesis de la pasteurelosis bovina incluye factores de virulencia bacteriana y de inflamación, que en conjunto conducen a fallas respiratorias y a la muerte (Chin *et al.*, 2000).

De acuerdo a estos antecedentes, y aunado a los escasos reportes sobre pasteurelosis neumónica en la Comarca Lagunera, el objetivo de la presente investigación fue conocer la frecuencia de aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* en animales con signos respiratorios característicos de neumonía, en época de frío.

2. Antecedentes

2.1. Taxonomía

El Género *Pasteurella* pertenece a la familia de las *Pasteurellaceae* (Blanco *et al.*, 1990). En 1921, Jones informó de tres grupos de *Pasteurellas* en bovinos y otras cepas atípicas puestas en un grupo de *Bacillus bovisepcticus* (Angen, *et al.*, 1999). Estas cepas las caracterizaron después Newsom y Cross (1932), quienes propusieron el nombre *Pasteurella haemolytica* para el grupo de *Bacillus bovisepcticus*. Dos biotipos de *P. haemolytica* fueron descritos por Smith (1959, 1961) basados en varios caracteres fenotípicos así como por las diferencias patológicas y epidemiológicas. Estos biotipos fueron designados A y T refiriéndose a la habilidad de fermentar arabinosa o trealosa. Una tercera taxonomía de *P. haemolytica* fue propuesta por Frederiksen (1973) para cepas que no estaban dentro de los primeros biotipos A y T (Angen *et al.*, 1999).

P. haemolytica consistía en 13 serotipos capsulares, designados como A1, A2, A5 a A9, A11 a A14, A16, y A17 (Davies *et al.*, 1997). Posteriormente, *Pasteurella haemolytica* fue nombrada *Mannheimia haemolytica*, como tributo a Walter Mannheim, un microbiólogo cuya búsqueda fue mejorar la clasificación taxonómica de la familia *Pasteurellaceae*, de acuerdo a sus características moleculares (Angen *et al.*, 1999).

En la creación del género *Mannheimia*, se reconocieron cinco especies: *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. ruminalis* y *M. varigena* (Blackall *et al.*, 2001, , Blackall, *et al.*, 2002, Angen. *et al.*, 2002).

Del género de las *Pasteurellas* las especies más importantes son *P. multocida*, *P. pneumotropica*, *P. gallinarum* y *P. trehalosi*. *P. multocida* esta subclasificada en tres subespecies, *P. multocida* subespecie *gallicida*, *P. multocida* subespecie *multocida* y *P. multocida* subespecie séptica (Davies

et al., 2004).

Los aislamientos de *P. multocida* están agrupados dentro de 5 tipos serológicos que son: A, B, D, E y F y 16 serogrupos de origen somático (Dowling. *et al.*, 2002). Basándose en los antígenos capsulares, los serotipos A y D causan severas bronconeumonías en vacas (Dowling *et al.*, 2002; Jaramillo *et al.*, 1987) y están relacionados entre el serogrupo capsular y la enfermedad (Davies *et al.*, 2004). El tipo C fue suprimido y se adicionó posteriormente el tipo E (Jaramillo *et al.*, 1987).

2.2. Morfología bacteriana y de colonia

Las bacterias del género *P. multocida* son cocobacilos pequeños, gram negativos, no móviles que requieren de medios enriquecidos con suero o sangre para lograr un crecimiento adecuado. Las colonias se hacen visibles después de 24 horas a 37 °C, usualmente miden de 2 a 3 mm de diámetro, son circulares, grisáceas y no producen hemólisis. Algunas cepas producen colonias mucoides (Hernández *et al.*, 2003).

M. haemolytica son bacterias gram negativas, no móviles, cocobacilos pequeños (Angen *et al.*, 1999). En el caso de *M. haemolytica* las colonias son circulares, lisas, grisáceas, en agar sangre y miden de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 horas de incubación son más pequeñas que *P. multocida* y capaces de producir hemólisis completa en placas de agar sangre de bovino, que en ocasiones no es más grande que la colonia y por lo tanto no es aparentemente a menos que quite la colonia (Hernández *et al.*, 2003; Angen *et al.*, 1999).

2.3. Especies afectadas

Los miembros del género *Pasteurella* son patógenos reconocidos de muchas especies de animales (Blackall, et al., 2002). La *Pasteurella multocida* es un patógeno oportunista de animales silvestres y domésticos así como del hombre (Dowling. et al., 2002), es un patógeno muy común de los animales, se asocia con enfermedades que incluyen septicemia hemorrágica en el ganado y búfalos y rinitis atrófica en cerdos (Miranda *et al.*, 2004), donde tiene la habilidad de colonizar la mucosa nasal del cerdo y ha mostrado adherencia al epitelio de la mucosa de nasofaringe de conejos (Ruffolo *et al.*, 1997), cólera aviar en aves silvestres y domésticas. El cólera aviar es una enfermedad altamente contagiosa y causa significativas pérdidas económicas a la industria avícola de todo el mundo (Miranda *et al.*, 2004).

Se han encontrado 19 aislamientos de bacterias gram-negativas, cuyas características fenotípicas son consistentes con la identificación de los miembros de la familia Pasteurellaceae, estas bacterias se aislaron de varios tejidos de mamíferos marinos, sin embargo, la importancia patológica de estos microorganismos para las especies de mamífero de mar de las que fueron aisladas no está clara (Foster *et al.*, 1996).

Algunos serotipos de *M. haemolytica* probablemente son parte de la microflora residente del tracto superior respiratorio de los rumiantes (Angen *et al.*, 1999).

2.4. Zoonosis

La neumonía en humanos es la manifestación más común de infección respiratoria causada por *Pasteurella*, y los pacientes pueden presentar agudamente o insidiosamente fiebre, disnea y pleuritis. El organismo también puede ser oportunista y afecta a pacientes inmunocomprometidos, causando neumonía en pacientes con SIDA y por deficiencias de

inmunoglobulina A. Raramente *Pasteurella* provoca osteomielitis, infecciones intrabdominales, artritis séptica, sepsis, y meningitis (Chen *et al.*, 2002).

En la mayoría de los casos de enfermedad, el microorganismo ha sido directamente adquirido a través de mordeduras o inhalación de aerosoles o indirectamente por el contacto con fomites contaminados o con las secreciones de animales. Interesantemente, *Pasteurella* también puede volverse parte de la flora del tracto respiratoria normal en los humanos. Se ha encontrado en los estudiantes veterinarios sanos y negociantes de animales sin ningún síntoma pulmonar (Chen *et al.*, 2002).

2.5. Lesiones

La presentación y severidad de las lesiones neumónicas en becerras depende de una serie de interacciones complejas entre diversos agentes infecciosos y varios factores de manejo que provocan estrés, tales como: el nivel de inmunoglobulinas del calostro, el tipo de alojamientos donde se mantienen las becerras, o la presencia de gases, producto de orina o heces en dichos alojamientos (Pijoan *et al.*, 1999).

La pasteurelosis neumónica es una pleuroneumonía aguda fibrinosa y necrosante caracterizada por una infiltración de neutrófilos (Ackermann *et al.*, 1999) dentro del alvéolo (Lafleur *et al.*, 1998) Los neutrófilos son benéficos en las infecciones bacterianas, las proteínas granulares antibacterianas y proteasas matan y degradan a las bacterias (Mitchell *et al.*, 2003). Sin embargo los productos de los neutrófilos tienen la capacidad para dañar el tejido pulmonar y las citocinas derivadas de neutrófilos son capaces de incrementar la respuesta inflamatoria reduciendo la ventilación alveolar y el intercambio gaseoso en el pulmón inflamado (Mitchell *et al.*, 2003) acumulación de fibrina y edema, fluido contenido en el alvéolo, superficie de la pleura, septo interlobular, hemorragias, trombosis vascular y necrosis

coagulativa del parénquima pulmonar (Lafleur *et al.*, 1998). Las características de esta enfermedad incluyen necrosis, pleuritis fibrinosa e infiltración de células inflamatorias (Marciel y Highlander, 2001), aunque diversos virus tales como PI3, sincitial respiratorio o IBR, así como micoplasmas (*Mycoplasma bovis*, *M. dyspar*), se distinguen como agentes predisponentes a la presentación de las neumonías en becerras, ya que las lesiones pulmonares iniciales generalmente los daños más severos son producidos por *Pasteurella haemolytica* biotipo A, *Haemophilus somnus*. *P. haemolytica* A, el serotipo 1 es el que más frecuentemente se aísla de pulmones neumónicos, así como de la cavidad nasal de bovinos con enfermedad respiratoria aguda (Pijoan, *et al.*, 1999). *M. haemolytica* A2 es responsable de las pasteurelosis encontradas en rumiantes salvajes. (Kodjo, *et al.*, 1999).

2.6. Patogenia e inmunidad

La adhesión e invasión de los tejidos de un hospedero tienen pasos cruciales en la patogénesis de muchas bacterias, parásitos y virus. En muchos casos la adhesión es un prerrequisito para la subsecuente colonización del epitelio. Las Adhesinas son proteínas especializadas de superficie estas regulan la adhesión bacteriana (Harmunt *et al.*, 2004).

Las adhesinas identificadas para algunos miembros de la familia Pasteurellaceae incluyen diferentes proteínas (fimbrias, fibrillas y proteínas de membrana externa) así como polisacáridos - lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares (Jaramillo, *et al.*, 1999).

Éstas reconocen específicamente receptores en la superficie de las células blanco del hospedero, determinando el tropismo del patógeno por el tejido. La invasión secundaria a la adhesión permitiendo a las bacterias evadir la respuesta inmune humoral y la proliferación en un nicho protegido. Al evadir

la eficiente fagocitosis las bacterias habitualmente dañan el citoesqueleto de las células del hospedero. Esto provoca señales masivas de las células del hospedero principalmente la concurrencia del mecanismo de la fagocitosis induciendo a su aprehensión (Harmunt *et al.*, 2004).

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica serotipo A1 es el principal patógeno bacteriano de la pasteurelosis bovina, una aguda pleuroneumonía fibrinosa aguda, la cual causa grandes pérdidas económicas a la industria ganadera en Norte América y otras partes del mundo. *M. haemolytica* A1 es comúnmente encontrada en las criptas de las tonsilas y en el tracto respiratorio alto de ganado sano. En conjunto con la activación de infecciones virales y factores de estrés *M. haemolytica* llega a los pulmones por inhalación, donde se multiplica rápidamente. *M. haemolytica* produce diversos factores de virulencia, de los cuales la leucotoxina extracelular (Lkt) es considerada como una de los más importantes, responsable del daño a leucocitos en el pulmón. Lkt-inducida por lisis de neutrófilos y degranulación esta implicada como la principal causa de la inflamación aguda característica de pasteurelosis neumónica. La leucotoxina (Lkt) es una glicoproteína la cual se produce durante la fase logarítmica del crecimiento bacterial *in vitro*. La Lkt secretada por *M. haemolytica* es específica para los leucocitos de los rumiantes (Deshpande *et al.*, 2002).

Subsecuentemente, las integrinas $\beta 2$ han sido bien identificadas como los receptores para Lkt de *M. haemolytica*. Las $\beta 2$ integrinas son integrinas leucocito-específicas las cuales tienen una subunidad común, la subunidad β , CD18. Las Lkt ligadas a toda la gama de $\beta 2$ integrinas, sugiere que esta subunidad β CD18, es la subunidad que regula la citolisis de leucocitos bovinos inducida por las Lkt (Deshpande *et al.*, 2002).

Los aislamientos del serotipo A1 son los responsables para la mayoría de los casos de pasteurelosis neumónicas del bovino, aunque en menor proporción

la enfermedad es causada por el serotipo A6. Los aislamientos del serotipo A2 se han recuperado de la nasofaringe del ganado saludable pero raramente es el responsable de la enfermedad; otros serotipos normalmente no se asocian con animales saludables o enfermos. El serotipo A2 es el más comúnmente aislado de los casos de pasteurelisis neumónica de ovino. Además, un rango más grande de serotipos es asociado con la enfermedad en la oveja, particularmente los serotipos A1, A6 a A9, A11, y A12, aunque sus aislamientos son menos frecuentes que los aislamientos del serotipo A2 (Davies *et al.*, 1997).

2.7. Factores de virulencia

La bacteria es inhalada al pulmón, donde se encuentra en un medio ambiente diferente al de la nasofaringe. Esto puede suponer que la bacteria experimenta cambios en la temperatura, concentración de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y moléculas como hierro, además la bacteria esta frente al sistema inmune del hospedero y requiere de la formación de defensas, variaciones en el micro medioambiente de *M. haemolytica* puede señalar la modulación de la expresión de leucotoxinas (Marciel y Highlander, 2001).

Mannheimia haemolytica A1, en conjunto con el estrés e infecciones virales, migra a los pulmones donde se multiplica rápidamente (Sarasola *et al.*, 2002), y produce diversos factores de virulencia de los cuales la leucotoxina extracelular (Lkt) es considerado el más importante responsable del daño a leucocitos en el pulmón, Lkt induce la lisis de los neutrófilos y degranulación implicados como la principal causa de la inflamación aguda característica de la pasteurelisis (Chin *et al.*, 2000). La leucotoxina es una glicoproteína la cual se produce durante la fase logarítmica de crecimiento bacteriano *in vitro* (Sarasola *et al.*, 2002). facilitando la proliferación bacteriana matando o incapacitando macrófagos alveolares y neutrófilos (Davies *et al.*, 1997).

3. Justificación

Las enfermedades respiratorias de los bovinos se han estudiado como entidades independientes; sin embargo, se sabe que en la presentación de estas enfermedades se conjugan una serie de factores y agentes patógenos, por lo que se llama complejo respiratorio bovino, el cual se caracteriza clínicamente por fiebre, disnea, descarga nasal y evidencia de neumonía mediante la auscultación pulmonar (Juárez *et al.*, 2003).

Mannheimia haemolytica serotipo A1 es el principal patógeno bacteriano de la pasteurelosis bovina, una aguda pleuroneumonía fibrinosa aguda, la cual causa grandes pérdidas económicas a la industria ganadera en Norte América y otras partes del mundo (Deshpande *et al.*, 2002).

Pasteurella multocida es aislada con menor frecuencia que *M. haemolytica*, y participa de manera importante en el complejo respiratorio de ovinos y bovinos, produce una bronconeumonía supurativa que se vuelve crónica, pero al resolverse deja manifestaciones de cicatrización y abscesos, con frecuencia afecta al 50% del pulmón al momento de la muerte (Timoney *et al.*, 1988).

La Comarca Lagunera es una de las cuencas lecheras más importantes de México, de acuerdo a los antecedentes descritos y considerando que en la región no hay estudios de este tipo, la finalidad de la presente investigación es determinar la frecuencia de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, en bovinos Holstein clínicamente enfermos, ya que son agentes causales de neumonías de gran impacto económico para las explotaciones lecheras.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Determinar la frecuencia de aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* en bovinos Holstein clínicamente enfermos de neumonía en la Comarca Lagunera.

4.2. Objetivos Específicos

Diferenciar los aislamientos entre *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* utilizando técnicas bioquímicas.

Determinar la frecuencia de aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* utilizando hisopos nasales.

5. Material y Métodos

5.1. Marco de Referencia

La Comarca Lagunera se ubica en la zona norte-centro de México, al suroeste de Coahuila, colindando con el noreste de Durango. Los municipios que la integran por parte de Coahuila son: Torreón, Matamoros, San Pedro de las Colonias, Francisco I. Madero y Viesca. Los municipios de Durango son: Gómez Palacio, Lerdo, Tlahualilo de Zaragoza, Mapimí, San Pedro del Gallo, San Luis del Cordero, Rodeo, Nazas, Cuencamé de Ceniceros, General Simón Bolívar y San Juan de Guadalupe.

Los estudios bacteriológicos se realizaron en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna.

5.2. Toma de muestras

El estudio realizado fue de tipo descriptivo, prospectivo y transversal. Se visitaron 24 unidades productivas totalmente al azar, distribuidas en la Comarca Lagunera (cuadro 1). El muestreo en los hatos lecheros fue aleatorio, tomándose el 2% de la población total, en ésta el 30% corresponde a animales mayores de un año. Se obtuvieron 78 muestras de exudado nasal de becerros con signos clínicos de trastornos respiratorios.

Las muestras fueron recolectadas del enero a abril del año 2004. Se tomaron con hisopos estériles y se transportaron con medio Stuart y carbón activado, fueron refrigeradas por menos de 24 hr a una temperatura de 8°C hasta el momento del cultivo microbiológico

Para el cultivo microbiológico se utilizaron medios de agar enriquecidos con sangre de bovino para lograr un crecimiento adecuado. Se incubaron durante

24 horas a 37 °C, después de un crecimiento positivo se seleccionaron colonias con características compatibles a las de *Mannheimia haemolytica* y *P. multocida* se realizaron tinciones de Gram y pruebas bioquímicas para diferenciar los tipos de aislamientos.

Cuadro 1. Número de unidades productivas y número de bovinos Holstein clínicamente enfermos de neumonía.

No. UP	Total Animales	Enfermos <1 año	Enfermos >1 año	Total muestreados
1	2900	39	19	12
2	3450	47	22	9
3	4200	60	24	0
4	4250	63	22	0
5	900	12	6	1
6	300	4	2	0
7	1000	15	5	3
8	1900	26	12	0
9	1050	14	7	0
10	4900	76	22	0
11	1500	21	9	1
12	800	12	4	1
13	1500	21	9	13
14	4000	55	25	5
15	2500	33	17	3
16	2100	28	14	1
17	2150	31	12	12
18	4350	60	27	2
19	3400	50	18	0
20	2000	28	12	3
21	2500	35	15	2
22	3050	43	18	0
23	1050	13	8	7
24	2500	37	13	3
Total	58250	823	342	78

6. Resultados

Para el cultivo microbiológico *P. multocida* requirió de medios enriquecidos con sangre de ovino. Las colonias se hicieron visibles después de 24 horas a 37 °C, usualmente midieron de 2 a 3 mm de diámetro y se observaron circulares, grisáceas y sin hemólisis. Algunas cepas produjeron colonias mucoides. En el caso de *M. haemolytica* las colonias fueron circulares, grisáceas, más pequeñas que *P. multocida* y con hemólisis completa que en ocasiones no fue más grande que la colonia y por lo tanto no fue aparente.

De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio, en términos cuantitativos los aislamientos de *Mannheimia haemolytica* de muestras de animales menores de un año clínicamente enfermos representaron un 7.9 % del total de las muestras recolectadas y de *Pasteurella multocida* fue de un 6.6 % (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentajes de aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* de bovinos Holstein con neumonía de acuerdo con el número de muestras.

D i s c o	No.de Hatos/Muestras	Aislamientos	
		<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
	24/78	6 (7.6%)	5 (6.4%)

7. Discusión

La enfermedad ocurre frecuentemente en becerras de uno a cinco meses de edad, con una incidencia mayor en animales nacidos durante el otoño y el invierno. La presentación y severidad de las lesiones neumónicas en becerras depende de una serie de interacciones complejas entre diversos agentes infecciosos y varios factores de manejo que provocan estrés, tales como: el nivel de inmunoglobulinas del calostro, el tipo de alojamientos donde se mantienen las becerras, o la presencia de gases, producto de orina o heces en dichos alojamientos (Pijoan *et al.*, 1999).

Podría esperarse que en los animales enfermos de neumonía se podrían aislar con facilidad *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* sin embargo en el presente estudio no sucedió así lo cual se atribuye a que en todos los casos, los animales estudiados estuvieron en diferentes etapas de antibioterapia. El hecho de no haber aislado *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* o *Haemophilus somnus* en el presente estudio, por lo tanto, se atribuyó a los antibióticos que se les administraban en dosis altas a los bovinos que empezaban a mostrar semiótica respiratoria. Investigaciones similares realizadas por Juárez *et al.*, (2003), reportan resultados similares.

Paradójicamente, en estudios previos realizados en becerros Holstein aparentemente sanos, en la Comarca Lagunera, si se encontraron aislamientos altos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* (Flores, 2005). Según los datos obtenidos en este estudio y en contraste con el nuestro, se hace evidente que el número de aislamientos logrados a partir de muestras de animales sanos fue mayor que el de los enfermos. Esto se puede atribuir al hecho de que ambas bacterias, *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, forman parte de la flora bacteriana del tracto respiratorio de bovinos.

8. Conclusiones y sugerencias

El número de aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* logrados a partir de muestras de animales clínicamente enfermos fue escaso.

Esto se puede atribuir al hecho de que los animales clínicamente identificados como enfermos se encontraban en diferentes etapas de antibioterapia.

Se sugieren estudios posteriores de resistencia de tales microorganismos a diferentes antimicrobianos y antibióticos.

9. Literatura citada

Ackermann, M.R., Brogden K. A., Florance A. F. y Kehrli, M.E. (1999). Induction of CD18-Mediated passage of neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in pulmonary bronchi and bronchioles. *Infect Immun.* 67:659–663.

Angen, O.M., Caugant, R.D.A. Olsen, E.J. y Bisgaard, M. (1999). Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov." *Int J Syst Bacteriol* 49:67-86.

Angen, O., Ahrens P. y Bisgaard, M. (2002). Phenotypic and genotypic caracterización of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet. Microbiol.* 84:103-114.

Blanco, M.T., Morán, F.J., y Pérez, C. (2002). Resistencia bacteriana. Valoración de antimicrobianos. Manual de Bacteriología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill-Interamericana, Primera Edición.

Chen, H.I., Hulten, K. y Clarridge, J.E. (2002). Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. *J. Clin Microbiol* 40:3438-3441.

Chin, A.C., Lee, W.D., Murrin, K.A., Morck, D.W., Merrill, J.K., Dick, P., y Buret, A.G. (2000). Tilmicosin Induces Apoptosis in Bovine Peripheral Neutrophils in the Presence or in the Absence of *Pasteurella haemolytica* and Promotes Neutrophil Phagocytosis by Macrophages. *Antimicrobial Agents*

and Chemotherapy. 44:2465–2470.

Davies, R.L., Arkinsaw, D. y Robert, K. S. (1997). Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep. *Infect Immun*. 65(9):3585-3593.

Davies, R. L. (2004). Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiol*. 150 (12): 4199-4210.

Dowling A., Hodgson J. C. , Schock A., Donachie W., Eckersall P. D. y Mckendrick I. J. (2002). Experimental inducción of pneumonic pasteurellosis calves by intratracheal infección with *Pasteurella multocida* biotipo A:3. *Res. Vet. Scien*. 73:37-44.

Foster, H.G., Ross, M., Malnick, H., Willems, A., García, P., Reid, R.J. y Collins, M. D. (1996). *Actinobacillus delphinicola* sp. nov., a New Member of the Family *Pasteurellaceae* Pohl (1979) 1981 Isolated from Sea Mammals. *International J. System Bacteriol*. 46(3):648-652.

Flores, G.D. (2005). Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en Holstein clínicamente sanos de la Comarca Lagunera. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Unidad Laguna. Torreón, Coahuila.

Hartmut, H.N., Wolf-Dieter Schubert, y Dirk, W. Heinz. (2004). Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes and Infection* 6:101–112.

Hernández, S.M., Mojica, S.M., Rodríguez, R.A., Rodríguez, S.C., y Zaragoza, S.C. (2003). Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología

y Micología Veterinarias. Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. pag. 153-155.

Highlander, S.K., y Fedorova, N.D. (2000). Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* Leuckotoxin Causes Partial Attenuation of Virulence in a Calf Challenge Model. *Am. Soc. Microbiol.* 68:3916-3922.

Juárez, B.F., Trigo, T.F, Chávez, G.G. y Vargas, G.R. (2003). Identificación de agentes virales por inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda. *Vet. Méx* 34:1-12.

Kodjo, A., Villard, L., Bizet, C., Martel, J.L., Sanchis, R., Borges, E., Gauthier, D., Maurin, F.O. y Richard, Y. (1999). Pulsed-field gel electrophoresis is more efficient than ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. *Clin Microbiol* 37: 380-385.

Marciel, A.M. y Highlander, S.K. (2001). Use of Operon Fusions in *Mannheimia haemolytica* To Identify Environmental and cis-Acting Regulators of Leukotoxin Transcription. *Infect Immun* .69:6231–6239.

Miranda, Lo, Boyce, J.D., Wilkie, W. y Adler, B. (2004). Characterization of two lipoproteins in *Pasteurella multocida*. *Microbes and Infection.* 6:58–67.

Lee, H.Y., Kehrl, M.E., Brogden, K.A., Gallup, J.M. y Ackermann M.R. (2000). Influence of $\alpha 2$ -Integrin Adhesion Molecule Expression and Pulmonary Infection with *Pasteurella haemolytica* on Cytokine Gene Expression in Cattle. *Infect Immun*, 68:4274–4281.

Lefleur, R.L., Mitchell, S.A. y Maheswara, M.S. (1998). The biphasic mRNA expression pattern of bovine Interleukine-8 in *Pasteurella haemolytica*

Lipopolysacchride-stimulated alveolar macrophages is primarily due to Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infect Immun.* 4087 – 4092.

Pijoan, P.A., Aguilar, R.F. y Morales, J.A. (1999). Caracterización de los procesos neumónicos de becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet. Méx.* 30:149-155.

Pijoan, P.A. y Chávez, D.J. (2003). Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet. Méx.* 34:333-342.

Ruffolo, C.G., Tennent, J.M., Wojtek, Michalski, P. y Adler, B. (1997). Identification, purification and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun.* 65:339-343.

Trigo, T.F. (1991). Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Rev. Vet. Mex.* 22 (2): 31 134.

Wang, Z., Clarke, C.R. y Clinkenbeard, K.D. (1999). Role of Phospholipase D in *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin-Induced Increase in Phospholipase A2 Activity in Bovine Neutrophils. *Infect Immun.* 67(8):3768–3772.

Macouzet, S., Ocampo, C.L., y Sumano, L.H. (2000). Farmacocinética de la cefalona (CQMPCA) en vacas, una nueva serie de antimicrobianos. *Vet. Méx,* 31 (4): 287-292.

Blackalu, P., Angen, F.N., Blackall, L.L., Mutters, R. y Bisgaard M. (2001). Characterisation of a novel *Mannheimia* sp from Australian feedlot cattle. *Aust Vet J.* 79(9): 634-639.

Reggie, Y.C. (2001). Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia*

(Pasteurella) haemolytica A1. *Vet. Microbiol.* 83:23-35.

Blackall, P.J., Bisgaard M. y Stephenes. (2002). Phenotypic characterization of australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aust Vet J.* 80: 87-91.

Deshpande, M.S., Ambagala, T.C., Ambagala, A.P.N., Kehrli, M.E. y Srikumaran, S. (2002). Bovine CD18 Is Necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* Leukotoxin-Induced cytolysis. *Infect Immun*, 70: 5058–5064.

Jaramillo, M. L., Aguilar, F. R., y Trigo T. F. (1987). Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. *Vet. Méx.*18: 185-188.

Leite, F., O'Brien, S., Sylte, M.J., Page, T., Atapattu, D. y Czuprynski, C.J. (2002). Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils in vitro. *Infect Immun* 70:4336–4343.

McKerral, L.J. y Reggie Y.C. Lo. (2002). Construction and characterization of an ccapsular mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infect Immun.* 70:2622–2629.

Mitchell, G.B., Albright, N.B y Caswell, L.J. (2003). Effect of interleukin-8 and granulocyte colony-stimulating factor on priming and activation of bovine neutrophils. *Infect and immun.* 1643-1649.

Gutiérrez, P.J.A., Aguilar, R.F., Suárez, G.F., y Hernández, C.R. (2003).

Bacilos Gram Negativos Asociados al Aparato Respiratorio. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Microbiología y Microbiología Veterinarias. (UNAM)

Sarasola, P., Less, P., AliAbadi, F. S., McKellar, Q. A., Donachie, W., Marr, K. A., Sunderland, S. J. y Rowan, T. G. (2002). Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of danofloxacin administered by two dosing regimens in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Antimicrob Agents Chemother.*46(9):3010-3019.

Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott F. W. y Barloungh J. E. (1988). Hagan and Brumer's Microbiology and Microbial Diseases of Domestic Animals. Eighth Edition. Comstock Publishing Associates. 104-116.

Anexos

Anexo I. Requerimientos para cultivo in vitro

Para el aislamiento de *P. multocida* se requieren de medios enriquecidos con sangre para lograr un crecimiento adecuado. Las colonias se hacen visibles después de 24 horas a 37 °C, usualmente miden de 2 a 3 mm de diámetro, son circulares, grisáceas y no producen hemólisis. Algunas cepas producen colonias mucoides. En el caso de *M. haemolytica* las colonias son circulares, grisáceas, más pequeñas que *P. multocida* y capaces de producir hemólisis completa que en ocasiones no es más grande que la colonia y por lo tanto no es aparente a menos que se quite la colonia (Hernández *et al.*, 2003).

La siembra se realizó por estría múltiple en superficie, haciéndose cuatro diluciones, en la primera se colocó la muestra previamente recolectada, con el asa de siembra esterilizada se esparció el material a sembrar mediante estrías muy juntas entre sí, para las subsecuentes siembras se toca la siembra previamente realizada de 3 ó 5 veces con el asa (entre cada siembra se esteriliza el asa) para facilitar la dilución, asíéndose evidentes las colonias para su selección e identificación. Una vez identificadas las colonias son sembradas nuevamente para obtener cultivos que se remiten a pruebas bioquímicas: Oxidasa, para todos los Gram-negativos, Producción de Indol (SIM), Triple Azúcar Hierro(TSI) y Citrato de Simons para la identificación de *M. haemolytica* y *P. multocida*.

Anexo II. Pruebas bioquímicas

Tinción de Gram; modificación de Reed.

La tinción de Gram es aplicada en forma universal como primer paso en la identificación de las bacterias y levaduras. Este método divide a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo a los componentes predominantes de su pared celular y permite, así mismo la observación microscópica de la morfología (cocos, bacilos), el tamaño y la agrupación que presenten (cadenas, racimos). En el caso de las levaduras, por las características de su pared celular, se tiñen como Gram positivas.

Procedimiento: sobre la muestra ya fijada en el portaobjetos se añade violeta de genciana por un minuto, se enjuaga con abundante agua, enseguida se aplica lugol durante un minuto, nuevamente se enjuaga con abundante agua, agregar alcohol acetona 15 segundos, enjuagar y aplicar safranina por espacio de un minuto, finalmente enjuagar con suficiente agua.

Oxidasa (Método de Kovacs)

Esta prueba debe realizarse a todos los bacilos Gram negativos.

Determina la producción de la enzima citocromo oxidasa (indol fenol oxidasa).

Medios y reactivos. Se impregna un trozo de papel filtro (7cm de diámetro) con 2 a 3 gotas de solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil p-fenil-diamina. No dejar que el papel se seque completamente.

Mecanismo. Las bacterias que producen oxidasa son capaces de oxidar el reactivo, con la consecuente aparición de color.

Interpretación de resultados. Utilizando un asa de platino o un asa de vidrio tomar colonias del microorganismo a probar. Frotar las colonias sobre la superficie.

La aparición de un color púrpura intenso en 10 segundos indica una prueba positiva.

Reacciones tardías deben ser ignoradas. Una prueba negativa estará indicada por cualquier otro color o ausencia de color.

Producción de Indol.

Determina la habilidad de la bacteria para la producción de triptofanasa y oxidar el triptofano con producción de indol.

Medios y Reactivos. Se utiliza el medio SIM, al cual después del desarrollo bacteriano, se le agrega el reactivo de Kovac's (150ml de alcohol isomílico, amílico o butílico con 10 g de p-dimetil amino benzaldehído, al que se adicionan 50ml de ácido clorhídrico concentrado)

Mecanismo. La triptofanasa hidroliza el triptofano con la liberación de anillos indólicos libres y por lo tanto, indirectamente la producción de la enzima triptofanasa por parte de la bacteria.

Método de siembra, incubación e interpretación.

1. Inocular al medio de SIM por picadura con asa recta (2/3 partes del tubo) e incubar de 24 a 48 hrs. a 37°C.
2. Agregar al tubo de SIM unas gotas del reactivo. La prueba resulta positiva si se forma un anillo rojo en la superficie, cualquier otro color es negativo.

Triple Azúcar Hierro (TSI)

Prueba para diferenciar entre géneros de bacilos Gram negativos determina la capacidad para determinar azúcares, producción de ácido sulfhídrico y producción de gas por fermentación.

Medios y reactivos: El medio de TSI contienen agar, peptonas y sales

minerales; tres azúcares (Glucosa, Lactosa y Suctrosa) tiosulfato de sodio, sulfato ferroso y rojo de fenol como indicador de ph.

Mecanismo. Es una prueba donde se pueden apreciar tres resultados:

*Utilización de azúcares. El medio contiene lactosa, sacarosa y glucosa, carbohidratos que pueden ser utilizados mediante oxidación con la producción de ácido. Los cambios de ph son detectados por el rojo de fenol, dando amarillo con un ph ácido y rojo con un ph alcalino.

*Producción de gas. Algunos microorganismos producen gas como resultado de la fermentación de algunos carbohidratos.

Esta reacción se observa en el medio por la presencia de huecos, burbujas en el agar o incluso el desplazamiento del agar en el tubo por acción del gas que lo empuja.

*Producción de ácido sulfhídrico (H₂S). Algunas bacterias pueden reducir el tiosulfato de sodio a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con el sulfato ferroso del medio produciendo sulfuro de hierro. Esto se observa en el medio como un precipitado de color negro. La combinación de estas tres reacciones da lugar a seis lecturas posibles.

Método de siembra. Por picadura en fondo del tubo y estría continua en la superficie. El inóculo debe ser abundante. El tapón del tubo debe quedar ligeramente flojo para facilitar la eliminación del gas producido.

Incubación. De 18 a 24 horas como máximo. El prolongar la incubación puede dar lugar a lecturas falsas, ya que algunas reacciones pueden revertirse.

Para efectuar la lectura de producción de H₂S, puede incubarse adicionalmente hasta 40 horas.

Cuando no existe un buen crecimiento tanto en el fondo como en la superficie los resultados deben tomarse con reserva. Importante el medio SIM es de color rojo inicialmente, lo que indica alcalinidad, el cambio a amarillo acidez.

Interpretación de resultados.

Citrato de Simons.

Esta prueba determina la capacidad bacteriana para utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono. Se utiliza un agar que contiene 0.2% de citrato de sodio, al cual se le adiciona un indicador de pH (azul de bromotimol). La bacteria al utilizar el citrato, libera residuos de sodio que al unirse con radicales OH alcalinizan el medio, así el indicador de pH cambia de color verde a azul.

El método de siembra es por estría, incubándose a 37°C de 24 a 48 hrs. en ocasiones se puede prolongar este periodo hasta 7 días antes de considerar una reacción negativa, en este caso el medio permanece verde.