

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MEDICO VETERINARIAS



Aislamiento de microorganismos implicados en queratoconjuntivitis bovina

Por:

JOAQUIN ALFREDO LOPEZ BECERRA

TESIS

Presentada como requisito principal para obtener el título del:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Agosto 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MEDICO VETERINARIAS

Aislamiento de microorganismos implicados en queratoconjuntivitis bovina

Por:

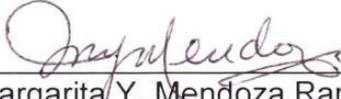
JOAQUIN ALFREDO LOPEZ BECERRA

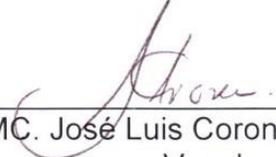
TESIS

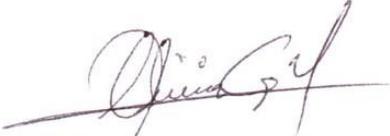
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:


MC. Margarita Y. Mendoza Ramos.
Presidente


MC. José Luis Corona Medina
Vocal


MC. Olivia García Morales.
Vocal


MVZ. Cuauhtémoc Félix Zorrilla
Vocal Suplente


MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Agosto 2018

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MEDICO VETERINARIAS

Aislamiento de microorganismos implicados en queratoconjuntivitis bovina

Por:

JOAQUIN ALFREDO LOPEZ BECERRA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título del:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

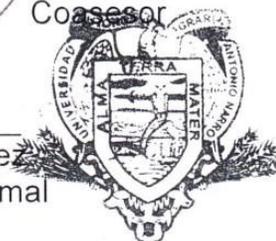
Aprobada por el Comité de Asesoría:

MC. Margarita Yolanda Mendoza Ramos
Asesor Principal

MC. José Luis Corona Medina
Coasesor

MVZ Olivia García Morales
Coasesor

MVZ José Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Agosto 2018

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

AGRADECIMIENTOS:

A mi escuela, “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro “Unidad Laguna”, quien me abrió sus puertas y me permitió formarme como profesionista, gracias a sus instalaciones y grandes catedráticos que incorporan sus filas.

A mi asesora la MC. Margarita Y Mendoza Ramos a quien admiro y respeto, quien, durante la realización de este trabajo y mi estancia en la carrera, me brindó su apoyo, fungió como guía, y siempre que necesite de su ayuda, estuvo ahí para mí.

Al MC. José Luis Corona Medina, por estar ahí desde mis primeros pasos dentro de la carrera, siendo un gran guía y apoyo, no solo durante la realización de mi trabajo, sino que, durante toda mi estancia en la carrera, una persona a quien admiro y respeto mucho.

Al MVZ Ramiro González Avalos, quien me apoyo y ayudo en todo momento con gran dedicación, quien se ganó mi admiración por esa gran visión que tiene ante el trabajo de la investigación.

A la MC Olivia García Morales, por ser mi guía durante mi trabajo en el área de laboratorio, y por siempre haberme ayudado y resuelto mis dudas.

A mis amigos, esos que me acompañaron y apoyaron durante toda mi carrera, con los que compartí buenos y malos momentos.

Al MVZ Fidel Torres Olvera, quien me acepto como voluntario en su clínica, en donde posteriormente me dio empleo, y que durante la realización de este trabajo me brindo horarios flexibles para poder concluir mi tesis, pero lo que más le agradezco es que me ha brindado de sus conocimientos sin recelo, paciencia y amistad,

A mis mascotas, Muñeca (donde quiera que estés), Chamoy, Rocko, Tobillo, Noah, Chimuelo, Lata, Piru, Rubius entre otras muchas que me acompañaron durante toda mi vida, que fueron una fuente inagotable de apoyo y felicidad, pero sobre todo a mi Fallecida Queen y mi extraviada Chiquita y Milk, que fueron quienes iniciaron mi amor por los animales y mi motivación para estudiar esta hermosa carrera.

DEDICATORIAS:

A mis padres

María Concepción Becerra Santa Cruz y Alfredo López Martínez por sus valores, apoyo, educación y amor que me brindaron desde pequeño, los cuales son la razón de haber llegado hasta donde estoy y más importante haber definido lo que soy ahora.

A mis hermanos

Jennifer López Becerra y Jesús Enrique López Becerra por haberme acompañado, apoyado y motivado en las distintas elecciones que tomé a lo largo de mi vida y sobre todo en mi carrera, razón por la que muchas veces pude llegar a incomodarlos, pero que siempre se mostraron positivos y comprensivos.

A Skarlent

Skarlent por haberme acompañado durante toda la carrera en donde me brindó su apoyo y motivación para cada vez poder llegar más lejos y ser mejor persona, por todos esos retos que superamos juntos, por nuestras alegrías y tristezas que pasamos, por ser una gran fuente de inspiración y alegría en una etapa importante de mi vida.

Resumen:

Para determinar la variedad etiológica durante un brote de queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB), se determinó realizar un estudio en un establo ubicado en Torreón, Coahuila, con el objetivo de dar a conocer otros agentes bacterianos que puedan participar con *Moraxella bovis* en el desarrollo de la enfermedad.

La QIB, es una enfermedad altamente contagiosa, de gran importancia económica, que causa pérdidas en la producción de leche al igual que pérdidas de peso y condición en animales infectados. La enfermedad afecta el sistema ocular, sus principales signos son conjuntivitis, opacidad corneal y úlceras. El principal agente causal es *Moraxella bovis*, aunque otras especies de *Moraxella spp.*, tales como *Moraxella bovoculli* y *Moraxella ovis*, son frecuentemente asociadas con casos de esta enfermedad. La enfermedad se distribuye por muchos países del mundo donde su mayor prevalencia sucede durante la temporada de verano.

Se recolectaron muestras de becerros que presentaban signos de la enfermedad, estas se sembraron en diferentes medios (Agar para métodos estándar, azul y eosina azul de metileno y gelosa sangre). De las distintas colonias que crecieron se determinó a que género pertenecían, usando como base sus características morfológicas y bioquímicas.

Se concluyó que es posible aislar otros agentes aparte de *M. bovis*, los cuales se valen de diversos mecanismos de patogenicidad para lesionar y participar en el desarrollo de la QIB.

Palabras clave: Queratoconjuntivitis infecciosa bovina, QIB, Agentes Bacterianos, *Moraxella bovis*, Baja producción, Pérdidas económicas.

Índice

AGRADECIMIENTOS:	i
DEDICATORIAS:	iii
Resumen:	iv
1.- Introducción.....	1
2.- Justificación.....	1
3.- Revisión de literatura	1
3.1.- Historia de la QIB	1
3.2.- Epizootiología	2
3.3.- Signología.....	4
3.4.-Patogenia.....	5
3.5.- Principales agentes aislados de ojos afectados por QIB	6
3.5.1- <i>Moraxella bovis</i>	6
3.5.2.- <i>Mycoplasma spp</i>	7
3.5.3.- <i>Staphylococcus spp</i>	9
3.5.4.- <i>Pseudomonas spp</i>	12
3.5.5.- <i>Pasteurella spp</i>	16
3.5.6.- <i>Chlamydia spp</i>	17
3.5.7.- <i>Sreptococcus spp</i>	19
3.5.8.- Vacuna contra QIB	21
4.- Hipótesis	22
5.- Objetivos	22
5.1.- Objetivo general	22
5.2.- Objetivos específicos.....	22
6.- Materiales y métodos.....	22
6.1.- Localización	23
6.2.- Selección de animales	23
6.3.- Técnica de toma de muestra	23
6.4.- Preparación de medios de cultivo, TSI y MIO	23
6.5.- Técnica de aislamiento.....	24
6.6.- Selección de colonias.....	24
6.7.- Técnica para siembra en medio TSI.....	24
6.8.- Técnica para siembra en medio MIO	24

6.9.- Prueba catalasa.....	25
7.- Resultados.....	25
8.- Discusión.....	25
9.- Conclusión.....	26
10.- Literatura citada:.....	27

1.- Introducción

La QIB a menudo es llamada "ojo rosado" a causa del enrojecimiento y la inflamación característicos de la conjuntiva del párpado y globo ocular (Leviosohn *et al.*, 2004). Es la enfermedad ocular más importante que afecta al ganado de todo el mundo. Los signos con los que suele presentarse son lagrimeo, conjuntivitis, opacidad corneal y ulceración. Aunque la mortalidad es baja, hay una alta morbilidad y una importante pérdida en la producción (Farias *et al.*, 2015).

Se considera a *M. bovis* el agente etiológico de la enfermedad (O'Connor *et al.*, 2012; Rochedo, 2003). Además de *M. bovis*, otros microorganismos han sido asociados con la QIB clínica. El virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, que causa conjuntivitis en vez de queratitis, pero también puede junto con *M. bovis* causar una enfermedad más grave. Se ha observado la participación de otros agentes bacterianos tales como *M. ovis*, *M. bovoculi*, *Pseudomona spp*, *Pasteurella hemolítica*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Neisseria catharralis*, *Mycoplasma bovoculi* y *Chlamydoiphila spp* (Alexander, 2010; Blood *et al.*, 1992).

2.- Justificación

La razón de esta investigación es comprobar que no solo *M. bovis* actúa como agente en el desarrollo de esta enfermedad, identificar y dar a conocer otros agentes que pudieran tener un papel importante durante el curso de la misma. Esto a su vez sería un paso para conocer la variedad etológica implicada en QIB en la región lagunera y a su vez ayudar en el tratamiento y prevención.

3.- Revisión de literatura

3.1.- Historia de la QIB

Las primeras descripciones del principal agente bacteriano responsable de la QIB fueron realizadas por Akkerman en 1886, Schimmel en 1888 y por Billings en 1889, quienes detectaron la presencia de finos y cortos bacilos con extremos redondeados en la córnea de bovinos afectados. El patógeno gram negativo aislado, fue identificado como bacilo Morax- Axenfeld y fue incapaz de producir la enfermedad en vacas y conejos. Aunque mitter en 1915 tampoco logro reproducir la enfermedad en vacas sanas, sugirió que la presencia de superficies erosionadas que se pusieran en contacto con el organismo, eran necesarias para poder reproducir la enfermedad. En el año 1919 se aisló un corto diplobacilo Gram negativo de cultivos de ojos afectados con QIB. Este bacilo fue asociado con el *Morax- Axenfeld* y se sugirió que la QIB se encontraba distribuida mundialmente y que ésta podía ser causada por el mismo microorganismo en diferentes países. Jones y Little en 1923 también aislaron un diplobacilo Gram negativo y reprodujeron la inflamación característica mediante la inoculación de un cultivo puro en los ojos de bovinos. A su vez, estudiaron las características bioquímicas de estos microorganismos y observaron que los mismos producían hemólisis en placas de agar suplementadas con sangre equina, licuaban la gelatina luego de 10 días de incubación a 22°C, no fermentaban carbohidratos,

presentaban células de 1-2 μm en longitud y 0,5 μm de ancho, eran capsulados, no móviles y no producían esporas. En 1937, Hauduroy y colaboradores clasificaron la bacteria descrita por Jones y Little como perteneciente al género *Haemophilus*. Posteriormente, Lwoff en 1939 la reclasificó dentro del género *Moraxella*, el cual incluía diplococos Gram negativos aislados de la mucosa nasofaríngea, conjuntiva y tracto urogenital. La QIB fue transmitida por transferencia directa de exudado ocular o nasal de bovinos infectados a bovinos sanos. Posteriormente, fue posible producir la infección experimental en terneros usando un cultivo puro de *Moraxella bovis*. A partir de este estudio se propuso desarrollar un agente inmunizador dado que los animales que se recuperaron de la QIB no fueron susceptibles a una reinfección con el mismo patógeno luego de un año de la infección experimental. A su vez, Barner encontró que la enfermedad llamada “ojo rosado” (del inglés *pink eye*) y que era causada por *M. bovis* en ganado bovino, era naturalmente infecciosa y por este motivo la queratoconjuntivitis fue llamada “Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina” (Torres, 2013).

3.2.- Epizootiología

El ojo rosado ocurre en todas las áreas ganaderas del mundo y es más prevalente en los meses de verano (Smith, 2015).

Los factores que predisponen al ganado a desarrollar ojo rosado incluyen: tiempo prolongado de exposición de la luz solar en la córnea, la presencia de algunas moscas, tales como (*Musca autumnalis*); razas susceptibles; irritantes mecánicos, tales como polvo (Alexander, 2010; Smith, 2015). La agresión entre animales debido a golpes o durante el hacinamiento al momento de la entrega y el tránsito, puede dañar el ojo, Todos estos traumas físicos ayudan a los patógenos a penetrar la córnea (Alexander, 2010).

La transmisión puede ocurrir por contacto directo entre el ganado o por transferencia mecánica de las piernas y de las piezas bucales de las moscas (*M. autumnalis*, *M. doméstica*, y *Stomoxys calcitrans*). Los animales portadores son la principal fuente de infección para los terneros. (Smith 2015). El Ojo rosado es altamente contagioso entre los bovinos de menos de 2 años de edad, pero también puede propagarse rápidamente entre los animales susceptibles más viejos, tomando en cuenta los factores ya mencionados (Odeon *et al* 2012; Smith 2015). La conjuntiva es la puerta de entrada más probable de la infección y los animales infectados probablemente se comporten como portadores (Turquieto *et al.*, 2008). Pughj y Hughes en 1971 aislaron *M. bovis* de la cavidad nasal de un ternero infectado, sugiriendo que éste era un mecanismo importante para el mantenimiento de la infección en los rodeos (Pugh y McDonald, 1986).

Un párrafo aparte merece el papel que desempeñan las moscas en la transmisión de la QIB. Se encontró una alta correlación entre los aislamientos del agente etiológico y el número de moscas presentes, estableciendo que la diseminación de *M. bovis* hacia rodeos vecinos comienza cuando la población de moscas excede las 10 moscas/animal durante un mes. La transmisión de *M. bovis* en ausencia de la

mosca de la cara por contacto es mínima y en ausencia de moscas, la transmisión y el grado de enfermedad son menores (Minatel y Corbellini, 2007) . La permanencia del agente en el ambiente es de pocas horas, sin embargo, en las moscas puede llegar a sobrevivir hasta cuatro días (Blood *et al.*, 1992). Para establecer el papel mecánico de la QIB por medio de las moscas, se realizó un estudio en el que se atraparon un promedio de ocho moscas de la cara de 20 animales clínicamente enfermos, muestreados al azar. Los resultados fueron 15/20 aislamientos *M. bovis*, determinando que las moscas son un factor de riesgo en la transmisión de QIB (Martínez *et al.*, 2000).

El estado de portador es otro de los factores en la ocurrencia cíclica de QIB porque los animales portadores pueden actuar como fuente de infección para el ganado joven susceptible (Brown *et al.*, 1998) . Se han reportado infecciones nasales y oculares por más de cuatro meses (Turquieto *et al.*, 2008) e incluso infecciones vaginales. Muchos de esos animales nunca habían presentado signos de la enfermedad ocular. La razón por la cual se produce el estado de portador es desconocida, aunque este fenómeno puede ser causado por la incapacidad de algunos animales de responder adecuadamente al estímulo antigénico (Pugh y McDonald, 1986).

Se determinó que los animales portadores poseen una mayor proporción de bacterias no piliadas (bacterias que carecen de estructuras cortas, finas y con forma de pelo, llamadas pili) y no hemolíticas que los infectados en forma aguda y estos transmitirían la infección a los terneros con presentación de signos clínicos (Turquieto *et al.*, 2008). La tasa de mortalidad es nula y los casos de ceguera permanente o pérdidas de los globos oculares son raros, sin embargo, la prevalencia puede llegar hasta el 80 % en el pico de la tasa de infección en la tercera o cuarta semana del brote. La incidencia en animales jóvenes suele ser alta, hasta el 90 % en rodeos afectados, con un 20 % o más de estos animales presentando ceguera temporal (Blood *et al.*, 1992).

Las razas de *Bos indicus* son más resistentes que las razas de *B. taurus*. La estructura encapuchada de los párpados de *B. indicus* puede ayudar a proteger la córnea de los efectos de la luz solar. El ganado Hereford es el más severamente afectado.

Las dificultades para prevenir y tratar la QIB y el consiguiente impacto en la industria ganadera en todo el mundo hacen hincapié en la necesidad de comprender mejor este proceso infeccioso junto con la biología de *M. bovis* su principal agente causal (Furmanek-Blaszczak *et al.*, 2013). En México la enfermedad tiende a tener más incidencia en las áreas áridas y semiáridas, donde además del medio ambiente, también influye el tipo de ganado europeo que se explota en esas zonas. En contraste, en las áreas tropicales su presencia es más esporádica, por el tipo de ganado que normalmente se produce. Sin embargo, algunas veces la QIB puede presentar brotes en las áreas del trópico (Martínez *et al.*, 2000).

3.3.- Signología

Se han registrado periodos de incubación desde 2 a 5 días, aunque se registran intervalos de hasta 3 semanas después de la inoculación experimental. El curso de la enfermedad es de 2 a 4 semanas.

Entre los signos más tempranos cabe destacar la hiperemia de los vasos corneales y el edema conjuntival, casi siempre acompañado de abundante lagrimeo acuoso, blefaroespasmo, fotofobia y en algunos casos fiebre, anorexia y disminución en la producción de leche (Angelos *et al.*, 2010; Carmo *et al.*, 2011). A medida que mejora la inflamación aguda, el lagrimeo se hace intenso (epífora), la conjuntiva se torna hiperémica, edematosa y se produce una conjuntivitis con descarga ocular serosa que puede transformarse en purulenta, transcurridos 1-2 días aparece una pequeña opacidad en el centro de la córnea que puede llegar a ulcerarse. Esta opacidad se va haciendo cada vez más extensa y en el momento de inflamación máxima, alrededor de 6 días después de los primeros signos, puede cubrir toda la córnea (Angelos *et al.*, 2010; Blood *et al.*, 1992). Suele ocurrir regresión durante las etapas iniciales de la enfermedad y la opacidad se comienza a contraer para curarse por completo al cabo de un curso total de 3 a 5 semanas, o bien las lesiones pueden progresar (Blood *et al.*, 1992; Turquieto *et al.*, 2008). Dos días después se forman una o más úlceras corneales superficiales de entre 1 y 4 mm de diámetro, siendo estos pequeños focos de necrosis epitelial que pueden aparecer como erosión, vesícula o pérdida del epitelio en todo su espesor. Entre los 5 y 7 días post-infección, las úlceras corneales aumentan y llegan a medir entre 5 y 20 mm de diámetro.

A medida que la enfermedad progresa, aparece un edema corneal severo, puede presentarse con hipopión, iridociclitis y queratocono (Turquieto *et al.*, 2008). Hay miosis a causa del dolor, exudado ocular mucopurulento, área extensa de necrosis (con o sin estafiloma), áreas de neovascularización, tejido de granulación denso y fibrosis corneal. También se aprecia una coloración de la córnea que va desde un tono blanco hasta el amarillo intenso. Únicamente en los casos en los cuales la enfermedad es grave, la córnea adopta forma cónica, con intensa vascularización y la ulceración del vértice de la zona inflamada produce lesiones profundas en el órgano, repletos de pus y rodeados de una zona de eritematosa. En estos casos es cuando puede llegar a suceder ruptura de la córnea y eventualmente ceguera (Carmo *et al.*, 2011).

La magnitud de las úlceras puede variar entre brotes a tal grado que los globos oculares pueden estallar y resultar en ceguera completa. Aproximadamente un 2% del ganado afectado queda con una opacidad residual muy leve. Se calcula que sólo en un bajo porcentaje de los casos quedan opacidades residuales. Se ha descrito que en el transcurso de un mes se puede constatar sintomatología en prácticamente la totalidad del ganado (Blood *et al.*, 1992).

3.4.-Patogenia

La patogenicidad de la forma virulenta de *M. bovis* es acrecentada por varias características. Las cepas patógenas de *M. bovis* están provistas de pilis que facilitan la fijación al epitelio corneal (William, 1995). Se han descrito dos tipos distintos de pili denominados I y Q con pequeñas diferencias de peso molecular y que son productos de genes distintos. El tipo de pili Q favorecería más la adhesión del agente al tejido corneal bovino que el tipo I. La capacidad de *M. bovis* para producir más de un tipo de pili podría incrementar su habilidad para evadir las defensas del huésped, el cambio de un tipo a otro le permitiría mostrar una heterogeneidad antigénica al sistema inmune que favorecería la evasión del microorganismo. Es posible que el pili I sea el responsable de mantener la infección una vez establecida, o quizás la infección persistente con organismos piliados I esté asociada con signos clínicos leves o con el desarrollo de una infección subclínica crónica. Las cepas que no tienen pili son apatogenas (Zielinsk, 2005). Los pili no sólo median la adherencia, sino que también promueven la endocitosis y son citotóxicos.

Se ha demostrado mediante cultivos de células epiteliales de córnea, que la adhesión de *M. bovis* ocurre dentro de los 15 minutos de establecido el contacto, y que está asociado a la presencia de pilis en la pared bacteriana. Resultados similares se obtuvieron con preparaciones de córnea y se pudo observar con microscopía electrónica de barrido que las bacterias se asociaban principalmente con las células oscuras del epitelio corneal. Estas células carecen prácticamente de micropliegues y representan poblaciones celulares más viejas. Una mayor proporción de células se observa cuando la tasa de recambio celular es mayor, como ocurriría en la exposición intensa a la luz solar, con el polvo o con otras condiciones ambientales (Minatel y Corbellini, 2007).

Al instalarse *M. bovis* pueden observarse erosiones microscópicas dentro de las primeras 12 horas, sin evidencia de una respuesta inflamatoria en la superficie del ojo, el primer hallazgo macroscópico es que el epitelio superficial se hace edematoso e hinchado, y hay cierta infiltración por los linfocitos. A medida que las lesiones se vuelven crónicas, se desarrolla hiperplasia y aumenta el número de linfocitos y células plasmáticas. Las capas más profundas son hiperémicas e infiltradas por linfocitos y leucocitos polimorfonucleares.

Una toxina dermonecrótica en la pared celular de *M. bovis* produce las lesiones típicas del ojo rosado en la córnea (Prieto *et al.*, 2013; Turquieto *et al.*, 2008). El rol de la hemolisina no se ha definido en el desarrollo de la lesión. Sin embargo, Prieto *et al.* 2013 se refieren a ella como toxina RTX y mencionan que es citotóxica para las células epiteliales corneales. Se ha demostrado que hay una sustancia oculopática específica en la savia celular de *M. bovis* que induce prurito ocular y lagrimeo en el ganado. En estudios histológicos se han observado numerosos neutrófilos rodeando las lesiones corneales. Esto podría indicar que la quimiotaxis de neutrófilos y la liberación de colagenasas serían los responsables de la

licuefacción del estroma corneal. La acción citotóxica de *M. bovis* sobre los neutrófilos, determinaría que estas células liberen las enzimas proteolíticas y mediadores inflamatorios lo cual aumentaría la severidad y prolongaría el tiempo de cicatrización de las lesiones corneales. Los neutrófilos dañados serían incapaces de eliminar el agente lo cual favorecería el aumento de bacterias viables en la córnea y prolongaría el curso de la enfermedad (Turquieto *et al.*, 2008).

Animales con ojo rosado muestran fotofobia, conjuntivitis simple, y una copiosa descarga serosa. Después de varios días la córnea muestra una leve nebulosidad y entonces puede ser edematosa y opaco. El centro de la zona edematosa puede desprenderse, dejando una úlcera. A veces se forma un descematocele; Si es así, el animal puede perder el ojo debido a la ruptura de la cámara anterior (Smith, 2015).

3.5.- Principales agentes aislados de ojos afectados por QIB

3.5.1- *Moraxella bovis*

M. bovis es una bacteria gram-negativa, diplobacilo, que mide 2µm de longitud y 1µm de ancho. No es móvil y no es formadora de esporas. Cuenta con una serie de pilis antigénicos. La proteína pilus de *M. bovis* comparte una amplia homología con la proteína pilus de *Bacteroides nodosus*; Sin embargo, solo las variantes fimbriadas (piliadas) pueden colonizar la conjuntiva (Smith, 2015). El organismo existe como una forma virulenta, hemolítica, de colonias rugosas cuando es patógena y como una forma avirulenta, anhemolítica, de colonias lisas en la conjuntiva de las vacas o de los terneros curados de la enfermedad (William, 1995). La pérdida de hemolisina y pili se correlaciona con una pérdida de virulencia. *M. bovis* necesita suero o sangre para un buen crecimiento. El organismo es proteolítico; no reduce los nitratos y no fermenta los carbohidratos. Es aeróbico, oxidasa positiva, y catalasa-variable (Smith, 2015). Aunque históricamente *M. bovis* es conocida como el agente primario de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) se ha reportado *M. bovoculi* y *M. ovis* se ven involucrados durante la patogénesis (Kowalski *et al.*, 2017).

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de queratoconjuntivitis infecciosa debe asociar el aislamiento del microorganismo al cuadro clínico, dado que la etiopatogenia puede deberse a distintos agentes microbianos y es muy importante conocer si se está en presencia de un brote, por la prodigiosa capacidad de diseminación del microorganismo, a través de vectores animados e inanimados ya descritos.

La primera etapa consiste en toma de la muestra con hisopo estéril, tratando de seleccionar material representativo (secreciones, lágrimas). Se aconseja efectuar la recolección en la fase inicial de la enfermedad, cuando hay predominio del agente causal, ya que posteriormente debido a las secreciones abundantes y la presencia de los insectos vectores, puede encontrarse muchos microorganismos de contaminación que enmascaren a *M. bovis*. La siembra debe hacerse en medios

enriquecidos (agar sangre, agar chocolate), los cuales debe incubarse a 36-37° C durante 24-48 h.

El desarrollo es de colonias pequeñas, redondeadas, grisáceas. En agar sangre son hemolíticas, pero cuando se observan con lupa el halo de hemolisis suele ser muy reducido, de allí que no siempre se detecta la actividad hemolítica en forma macroscópica. Por microscopia se ven cocoides o bacilos cortos gramnegativos. En cultivos viejos muestra marcada pleomorfismo. Las pruebas de identificación incluyen la determinación de presencia de oxidasa positiva, hidrolisis de gelatina y licuación de medios con suero. La reducción de nitratos a nitritos es negativa y es inactivo frente a hidratos de carbono. Pueden completarse los estudios con inmunodiagnóstico diferencial (Leardini, 2007).

3.5.2.- *Mycoplasma spp*

Los micoplasmas son organismos procariotas muy particulares por el hecho de carecer de pared celular, poseer un tamaño y un genoma extremadamente pequeño, requiere medios de cultivo altamente enriquecidos, formar colonias microscópicas y de morfología muy peculiar (forma de “huevos fritos”) y ser parásitos extracelulares de casi todas las especies animales (Cerda, 2007).

Entre los micoplasmas aislados ampliamente de frotis oculares de ojos afectados por QIB se encuentra *Mycoplasma bovoculi*. Se ha demostrado experimentalmente que la infección previa por *M. bovoculi* mejora y prolonga la colonización de *Moraxella bovis* y *Moraxella ovis*. Lo que sugiere que *M. bovoculi* puede desempeñar un papel en el desarrollo del síndrome de QIB. De hecho, debido a que no todos los laboratorios de diagnóstico clínico rutinariamente realizan aislamiento de *Mycoplasma spp.*, Se desconoce la prevalencia de esta clase de microorganismos (Levirosohn *et al.*, 2004). Lo anterior dicho se vio comprobado durante una investigación en la que Schnee y col. en 2015 aislaron los microorganismos de ojos afectados en distintos estadios de la enfermedad, resultando en que rebaños con alta prevalencia de *M. bovoculi* son más susceptibles a los brotes de QIB, posiblemente debido a una interacción sinérgica con *Moraxella spp.*

Morfología

Los micoplasmas son microorganismos pleomorficos debido a la falta de una pared celular rígida. Sin embargo, en condiciones de isotonicidad la forma típica de la mayoría de las especies es entre redonda y cocoide y de unos 0.3 a 1 um de diámetro. Algunas especies presentan una forma piriforme con una esfera en un punto extremo llamada estructura terminal el cual se considera que actúa como elemento de fijación a las células del hospedador (*M. gallisepticum*). La célula está recubierta por una membrana trilaminar lipoproteica. En la capa externa se ubican distintos tipos de proteínas entre las que se destacan las de citoadhesión, fundamentales en los procesos de colonización de tejidos. Algunas especies presentan una estructura capsular. Presentan escasa afinidad por los colorantes de

anilina por lo cual la coloración de Gram no se utiliza ya que no los tiñe o solo lo hace débilmente. La técnica más adecuada para su tinción es la Giemsa modificada y la inmunofluorescencia. Las colonias de micoplasmas se caracterizan por su pequeño tamaño (0,06 -0,4 mm) y su forma peculiar de “huevo frito” en la mayoría de las especies.

Inmunidad

Debido a su bajo poder inmunogenico por tratarse de estructuras tan simples y carecer de pared celular, la respuesta inmunológica no es muy buena. Esto también puede deberse a la ubicación tan superficial que presentan los micoplasmas sobre los tejidos. Sin embargo, los animales que se recuperan de la enfermedad se hacen relativamente resistentes a la infección.

Patogénesis

En términos generales los micoplasmas no son gérmenes altamente virulentos debido a la falta de factores de virulencia como capsula y toxinas o enzimas agresivas, con excepción de algunas especies (por ej., *M. mycoides subsp. mycoides*). Por tal motivo las enfermedades que ocasionan son de curso crónico y su mayor o menor gravedad dependerá de factores asociados como el manejo de los animales (densidad poblacional, temperatura, humedad, concentración de amoníaco ambiental, estrés, etc.), la edad de los mismos, la época del año (mayor agresividad en épocas frías) y especialmente infecciones secundarias víricas o bacterianas.

Los principales factores de virulencia asociados a los micoplasmas patógenos son la adhesión, las toxinas y productos metabólicos y la resistencia a la fagocitosis.

Adhesión: poder de fijación a las superficies celulares es un factor indispensable que permite a los micoplasmas iniciar la infección y colonización de los tejidos. Los mecanismos de adhesión varían según la especie de micoplasma y el tipo de célula hospedadora, pero en general están dirigidos por la presencia de proteínas en la superficie de la membrana celular de los micoplasmas (proteínas de citoadhesión).

Toxinas: las pocas reconocidas como factores de virulencia en los micoplasmas incluyen: hemolisinas; el galactano capsular de *M. mycoides subsp mycoides*, una glicoproteína de *M. bovis* y un lipoglucano de las especies de *Acholeplasma* que produce un efecto similar al de las endotoxinas, una exotoxina o neurotoxina proteinacea termolábil en *M. neurolyticum*.

Producción de metabolitos tóxicos: como el peróxido de hidrogeno que daña la membrana celular por oxidación de los lípidos de la célula hospedadora y el oxígeno activado que penetra en las células inhibiendo la actividad de las catalasas permitiendo que se acumule el peróxido de hidrogeno, son considerados importantes factores de virulencia.

En resumen, todos los mecanismos de virulencia detallados anteriormente generan lesiones tisulares superficiales y reacciones inmunológicas exacerbadas que originan las distintas presentaciones de enfermedades respiratorias, urogenitales y articulares (neumonía, pleuresía, serositis, aerosaculitis, alveolitis, queratitis, conjuntivitis, artritis, sinovitis, mastitis, salpingitis, ooforitis, vaginitis y uretritis). Se considera que la alteración del sistema inmunológico conduce a una progresiva inmunodepresión lo cual sumado al daño tisular incentiva la acción de patógenos secundarios que agravan la enfermedad.

Aspectos clínicos

Las enfermedades causadas por la mayoría de las especies de micoplasmas son de curso crónico y los periodos de incubación son muy variables ya que en general requieren de un factor estresante o asociado para que se manifiesten los signos clínicos. En líneas generales, el periodo de incubación puede ser de algunos días (10-12) hasta semanas e incluso meses.

Aislamiento

Esta técnica tal vez sea la menos empleada como método de diagnóstico debido a varios factores adversos como son los altos requerimientos nutritivos de los micoplasmas, la presencia de numerosas especies saprofitas de micoplasmas en los tejidos que dificultan el crecimiento de las especies patógenas, las contaminaciones bacterianas, la alta sensibilidad de las condiciones de transporte e incubación, el lento desarrollo, la necesidad de personal entrenado, etc. Sin embargo, esta técnica sigue siendo de mucha importancia en el diagnóstico y especialmente para fines de investigación o estudios de sensibilidad a antimicrobianos o epidemiológicos. Existen numerosos medios de cultivo especiales para el aislamiento de las distintas especies de micoplasmas (Friss, Hayflicks, Chanock, Frey, etc.). Son todos medios muy enriquecidos para brindar a cada especie los sustratos necesarios para cubrir sus requerimientos (Cerda, 2007).

3.5.3.- *Staphylococcus spp*

Son cocos esféricos, grampositivos, generalmente dispuestos en forma irregular como racimos de uvas. Son catalasa positivos, inmóviles, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos. Fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta el amarillo o dorado (Gentilini, 2007a). Son resistentes a la sequedad y se dispersan con facilidad por partículas de polvo a través del aire y de las superficies (Madigan *et al.*, 2009). El género *Staphylococcus* consta de aproximadamente 32 especies y 15 subespecies. Algunos estafilococos forman parte de la microbiota normal de la piel y las mucosas de los mamíferos y las aves: otras están asociadas con procesos supurativos, infecciones óseas, genitourinarias, de piel, tejidos blandos y oportunistas, septicemias e intoxicaciones alimentarias.

Características de cultivo

En medios sólidos, forman colonias redondeadas de 1 a 2mm de diámetro, de contornos netos y superficie lisa, opaca o mucoides. Según las especies, las colonias pueden ser de color blanco, y al tomar contacto con el aire o la luz, pueden ser pigmentadas. *S. aureus* produce colonias doradas, debido a pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. Estos pigmentos no se difunden al medio, y en medios líquidos y en anaerobiosis no se producen. En medios de cultivo con sangre ovina, equina o humana (agar cerebro corazón con el agregado del 5% de sangre desfibrinada), muchos estafilococos son hemolíticos, y producen una zona de hemólisis alrededor de las colonias.

Características bioquímicas

Los estafilococos son catalasa positivos. Utilizan los hidratos de carbono tanto por oxidación como fermentación. La temperatura óptima de crecimiento es de 37° C y el pH óptimo es de 7 a 7,5.

Principales características de los estafilococos

S. aureus es la especie que más se ha estudiado, los estafilococos han sido objeto de estudio en la última década, tanto en medicina humana como medicina animal.

Capsula: la capsula está constituida por polisacáridos unidos laxamente a la pared celular. La capsula protege a las bacterias de la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, también facilita que se unan a los catéteres, sondas, prótesis u otro material sintético. Esta propiedad, es indicador de patogenicidad.

Pared celular: el peptidoglicano de la pared celular es importante en la patogenicidad de la infección. Estimula la producción de interleuquina-1 (que actúa como pirógeno endógeno), de anticuerpos opsonicos en los monocitos, la agregación de los leucocitos polimorfonucleares (responsable de la formación de abscesos), posee actividad parecida a las endotoxinas, y activa el complemento.

Coagulasa y proteína de superficie: La superficie externa contiene una proteína denominada factor de agregación o coagulasa de unión, presente tanto en *S. aureus* como en *S. hycus*. Esta proteína se une al fibrinógeno por una reacción no enzimática y lo convierte en fibrina insoluble, haciendo que los estafilococos se agreguen o formen grupos. Existen otras proteínas de superficie relacionadas con adherencia a los tejidos del hospedador: las proteínas de unión al colágeno, a la elastina y la fibronectina.

Proteína A: Esta proteína, al combinarse con el fragmento Fc de las moléculas de IgG (excepto IgG3), produce agregación de cocos (impide la eliminación inmune mediada por anticuerpos) y es capaz de activar el complemento. La proteína A

puede actuar como factor de colonización al adherirse a proteínas involucradas en el proceso de hemostasis.

Productos celulares relacionados con la patogenicidad

S. aureus excreta varias proteínas con actividad biológica como enzimas y toxinas.

Enzimas

Coagulasa: La coagulasa soluble o libre es una proteína similar a una enzima que coagula el plasma oxalatoado o citratoado del hombre o el conejo, por activación de una sustancia parecida a la protrombina (una globulina, factor de reacción con la coagulasa). La coagulasa puede depositar fibrina sobre la superficie de los estafilococos, alterando la capacidad fagocítica de los macrófagos o su destrucción en el interior de estos.

Hialuronidasa: La hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico (mucopolisacárido presente en la sustancia intercelular del tejido conectivo) facilitando la diseminación de la infección.

Fibrinolisisina: También denominado estafiloquinasa, es un activador del plasminógeno, disuelve las redes de fibrina, aumentando la capacidad de invasión del microorganismo.

β -lactamasas: Las β -lactamasas son codificadas por plásmidos transmisibles por mecanismos de transducción y probablemente conjugación. Las bacterias productoras de β -lactamasas presentan resistencia frente a antibióticos β -lactámicos.

Toxinas

Hemolisinas: Son toxinas con acción nociva sobre las membranas celulares que llevan a la muerte y la lisis de las células. Las hemolisinas tienen actividad de fosfolipasas. Las toxinas hemolíticas se presentan en forma aislada, en combinación, o no se presentan.

Toxina-alfa: Es la mejor estudiada, actúa sobre una amplia variedad de membranas celulares, como, por ejemplo: eritrocitos, leucocitos, plaquetas, fibroblastos y células HeLa. Es letal para el conejo cuando se inocula por vía endovenosa y por vía subcutánea es dermonecrotica. La toxina-alfa contribuye de manera significativa a la patogenicidad al producir daño en los tejidos después del establecimiento de un foco infeccioso. La mayoría de las cepas humanas y alrededor del 50% de las cepas de origen bovino aisladas de mastitis la producen.

Toxina-beta: Es una esfingomielinasa C, causando lesión membranas.

Toxina-delta: actúa sobre las membranas biológicas por una acción similar a la de los detergentes. Es una toxina tensioactiva relativamente termoestable. Lesiona eritrocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas. No tiene especificidad pronunciada para las células de una especie en particular.

Toxina-gamma y lucocida de Pantón Valentine: Son toxinas polipeptídicas, que actúan sinérgicamente para dañar la membrana de las células.

Pruebas para la caracterización del género

Una vez establecida la morfología, es decir la agrupación celular que presentan microscópicamente los cocos grampositivos desarrollados en medio de cultivo, se determina. Positivo a la prueba de catalasa, capacidad para la fermentación anaeróbica de glucosa, incapacidad de producir coagulasa (Gentilini, 2007a).

3.5.4.- *Pseudomonas spp*

El género *Pseudomonas* está integrado por numerosas especies, ampliamente distribuidas en la naturaleza, el suelo, el agua y en todo lugar donde existan materia orgánica en descomposición. De todas las especies (más de 100) que integran este género, *Pseudomonas aureginosa* es la única que en el hombre y los animales reviste una enorme importancia clínica, aunque raramente constituye el agente primario de la enfermedad. El aislamiento en cultivo puro de *P. aureginosa* constituye un fuerte indicio de patogenicidad, en especial en pacientes con tejidos debilitados por quemaduras o traumas, con heridas, neoplasias, inmunosuprimidos o con antecedentes de tratamiento con antibióticos y corticoides, por la resistencia que presenta esta bacteria a numerosos antibióticos.

Existen especies que ocasionalmente pueden ser patógenas para las plantas y los vegetales.

El género *Pseudomonas* está integrado por bacilos gramnegativos, móviles por flagelos polares, aerobios estrictos, aunque algunas especies pueden utilizar procesos de desnitrificación como forma de respiración anaeróbica. Crecen con facilidad en medios nutritivos simples. Son bacilos no fermentativos, oxidasa positivos. Algunas especies son productoras de pigmentos solubles en agua.

Palleroni (1984), por estudios de hibridación del rRNA/DNA, clasifica al género en cincogrupos, donde *P. aureginosa* integra el grupo 1, dentro de las *Pseudomonas fluorescens*. Actualmente algunos de estos grupos tienen la categoría de géneros (por ej., el grupo II, integrado por *P. mallei*, *P. pseudomallei* y *P. cepacia*, hoy constituyen el género *Burkholderia*).

En la actualidad, *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, del orden *Pseudomonadales*, clasificado como Gammaproteobacterias dentro de las Proteobacterias, según la segunda edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey.

Pseudomonas aureginosa

Hábitat

Es un microorganismo de amplia distribución en la naturaleza, que se encuentra frecuentemente en el suelo, el agua, en todo lugar donde exista materia orgánica en descomposición y ocasionalmente en la piel, la nasofaringe, tubo digestivo del hombre y animales sanos.

Morfología

P. aureginosa es un bacilo gramnegativo de 0,5 a 1 μm por 3 a 4 μm , móvil por la presencia de uno a tres flagelos polares. Posee pili y fimbrias. No forman esporas. Algunas cepas están rodeadas de una capa de mucus o polisacárido extracelular denominado *biopelículas*.

Características de cultivo y bioquímicas

Es un bacilo aerobio estricto, utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque puede crecer en un ambiente anaeróbico empleando nitratos como aceptor terminal de electrones.

No tienen exigencias nutritivas y crece en medios comunes de laboratorio. En medios sólidos puede formar dos tipos de colonias; una grande de 3 a 5mm de diámetro, lisa, con centro elevado y bordes ondulados (se parece a un huevo frito, y otra pequeña (alrededor de 2 mm), rugosa y convexa. En ocasiones se puede observar un tercer tipo de colonias de aspecto mucoso, cuando las cepas aisladas son productoras de biopelículas.

También puede cultivarse en agar Mac Conckey y en todos los medios utilizados para el crecimiento de las enterobacterias. Un medio selectivo de elección es agar cetrimida, por la resistencia que presenta esta especie a los compuestos de amonio cuaternario.

P. aureginosa es quimioorganotrofa y se considera mesófila. No se desarrolla a 4 C, pero sí entre los 10 y 42 C, siendo la temperatura óptima de crecimiento de 35 C. Su crecimiento a 42 C ayuda para diferenciarla de otras especies que integran el género.

Se desarrolla en 24-48 horas a pH 7. Los cultivos desprenden un aroma dulzón muy característico, "como de uvas", que ayuda a la identificación.

Las *Pseudomonas* son capaces de producir pigmentos. *P. aeruginosa* produce por lo menos cuatro pigmentos: piocianina, fluoresceína o pioverdina, piorrubina y piomelanina, siendo la única especie que produce piocianina, un pigmento azul verdoso. Este pigmento no colorea las colonias, sino que se difunde en el medio,

favoreciendo la detección y facilitando el diagnóstico de laboratorio. La piocianina (del griego, “pus azulado”) es producida por casi el 90% de las cepas y es responsable del característico pus azul de las heridas. Gessard, en 1882, aisló el cultivo puro y demostró que el pigmento azul-verdoso que aparecía en los apósitos quirúrgicos era producido por *P. aeruginosa*; este pigmento posee actividad antibacteriana e incluso fungicida.

La piocianina (N-metil-hidroxifenazina) es una fenacina soluble en agua, cloroformo y éter. La pioverdina o fluoresceína emite fluorescencia a la luz ultravioleta. Es soluble en agua e insoluble en cloroformo. Ambos pigmentos son productos de oxidación de precursores incoloros. Algunas cepas producen piorrubina de color rojo y piomelanina de color marrón-negro.

La producción de pigmentos depende de la presencia de hierro en el medio de cultivo o sustrato en el cual se desarrollan. *P. aeruginosa* elabora bacteriocinas o piocinas, sustancias de acción bacteriostática sobre cepas del mismo género. Bioquímicamente es catalasa y oxidasa positiva (la presencia de citocromo o oxidasa permite diferenciar a las pseudomonas de las enterobacterias), licua la gelatina, es ureasa positiva, posee la enzima arginina dihidrolasa y es capaz de reducir los nitratos.

En agar sangre produce B-hemólisis. No fermenta los carbohidratos, pero muchas cepas oxidan glucosa. Utilizan el citrato de sodio como única fuente de carbono.

Características serológicas

P. aeruginosa es antigénicamente heterogénea. Los serotipos están basados en el antígeno O (termoestable): y este es el marcador más constante. La respuesta inmunitaria frente al lipopolisacárido (LPS) se manifiesta por la producción de IgM. Se han identificado otros antígenos, flagelares, fimbriales, mucoides y de exoenzimas como proteasas.

Factores de agresión de *Pseudomonas aeruginosa*

La virulencia de este microorganismo es multifactorial. Presenta componentes propios de la célula, como el LPS, pili, alginatos y productos extracelulares, como enzimas y toxinas.

P. aeruginosa, por conjugación a través de plásmidos R, codifica resistencia a la mayoría de los antibióticos y esta se manifiesta unida a la resistencia a metales pesados. Esta característica le permite sobrevivir en condiciones en que muy pocos microorganismos lo hacen.

Factores de adherencia: los pili facilitan la adhesión a las células epiteliales, permitiendo la colonización. También coloniza tejidos profundos y expuestos, como ocurre en las quemaduras y heridas.

Las cepas productoras de biopelícula, que impide la acción de los anticuerpos. La actividad de los antibióticos sobre las cepas productoras de alginato está influenciada por la carga negativa de los polisacáridos. Es así como los antibióticos con carga negativa (cefalosporinas de tercera generación y la piperaciclina) son repelidos. En cambio, los aminoglucosidos y las polimixinas (colistina), al ser atrapados por su alta carga positiva, penetran el alginato, explicando la acción local de estos antibióticos. La acción de los factores de adherencia puede ser favorecida por la actividad de proteasas de células del paciente (las proteasas traqueales liberan a las células epiteliales de la capa de fibronectina que normalmente impide la adherencia *P. aeruginosa*).

Endotoxina: el lípido A, componente de la endotoxina de la pared celular, con efectos biológicos en la sepsis bacteriana.

Exotoxinas: es uno de los factores de virulencia más importantes. Es letal para el ratón. La acción de la exotoxina A sería responsable de la dermatonecrosis que ocurre en las quemaduras, del daño de córnea en las infecciones oculares y del daño tisular de las infecciones pulmonares crónicas. La toxina también es inmunodepresora y tóxica para los monocitos y la médula ósea de los animales y los humanos. Esta exotoxina tiene una acción similar a la toxina diftérica, pero es menos potente.

Exoenzimas S y T: producen daño en las células epiteliales, lo que facilita la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis.

Enzimas proteolíticas: la mayoría de las cepas producen enzimas proteolíticas capaces de degradar una amplia variedad de sustratos, como elastina, caseína, colágeno. Gelatina, fibrina. Proteasas extracelulares elastasas, proteasa alcalina.

Poder patógeno

Es raro que sea agente primario de infección: existen factores que predisponen a la aparición de una infección por *P. aeruginosa*.

Los pacientes más expuestos a infecciones son en general, los inmunodeprimidos, con quemaduras graves y extensas, heridas traumáticas, con procesos respiratorios, neoplasias, antecedentes de tratamientos con corticoides y antibióticos, y los animales jóvenes.

En todas las especies animales, *P. aeruginosa* es responsable de abscesos, diarreas, infecciones urinarias, genitales, respiratorias, heridas e infecciones intrahospitalarias.

Diagnóstico de laboratorio

El aislamiento y la identificación se realiza sembrando la muestra en medios simples durante 24-48 horas a 35° C, en anaerobiosis. El desarrollo en medio sólido se manifiesta por la aparición de colonias translúcidas, extendidas, con bordes ondulados semejantes a un huevo frito. La mayoría de las cepas produce piocianina

que, al difundirse al medio de cultivo, aparece de color azul verdoso, lo cual facilita la identificación. En agar produce B-hemolisis. Los cultivos tienen un olor a uvas característico.

Al colorear un extendido, se observan bacilos gramnegativos, cuya morfología no se diferencia de las enterobacterias. La movilidad se puede demostrar por observación entre porta y cubreobjetos.

Los bacilos son: oxidasa positiva, licúan la gelatina, peptonizan la leche tornasol, utilizan el citrato, reducen el nitrato, no producen indol. La prueba de oxido-fermentación (O/F) es positiva por oxidación (Gentilini, 2007b) .

3.5.5.- *Pasteurella* spp

Desde la primera descripción realizada por Rivolta en 1877, el género *Pasteurella* ha sufrido numerosos cambios en su ubicación taxonómica.

Pasteurella multocida es una de las pasteurelas de mayor relevancia en medicina veterinaria con tres subespecies *P. multocida ssp multocida*, *P. multocida ssp séptica* y *P. multocida ssp gallicida*, que incluyen a 5 serotipos capsulares (A, B, D, E y F) basados en el antígeno capsular y en 16 serovariedades o serotipos basados en los antígenos somáticos.

P. multocida puede causar neumonías o septicemias en muchas especies animales y aves. En algunos casos puede causar infección crónica de las vías respiratorias superiores y del oído medio, especialmente en conejos; procesos neumónicos en bovinos, ovinos, caprinos y otras especies y mastitis severas en rumiantes.

Hábitat

P. multocida es un microorganismo de distribución mundial, habitante y comensal de membranas y mucosas de las vías respiratorias altas, cavidad oral, tracto genital y digestivo de animales mamíferos y aves.

Características morfológicas

P. multocida incluye microorganismos ovoides o bacilos cortos, gram negativos, que presentan coloración bipolar, cuando se obtienen de tejidos, sangre o de aislamientos recientes en cultivos. Su tamaño es de 0,4 x 1,0-1,5 um de largo, son no esporulados, inmóviles aerobios y anaerobios facultativos, y en subcultivos repetidos pueden ser pleomórficos.

Características de cultivo

P. multocida crece en condiciones aeróbicas en medios enriquecidos con sangre o suero, como en agar nutritivo suplementado con 5% de sangre bovina, equina u ovina. Hay una considerable variación de las colonias, relacionadas con la virulencia

del microorganismo. Se reconocen tres tipos de colonias: Lisas (S) pequeñas y redondas, mucoides (M) grandes, y mucosas y rugosas (R) que son raras y normalmente carecen de cápsula.

Las colonias de *P. multocida* en agar sangre son normalmente no hemolíticas de color gris, translúcidas, con un característico olor dulce. Bisgaard ha observado algunas cepas de *P. multocida* con cierta actividad hemolítica. Colonias mucoides han sido descritas en aislamientos obtenidos de gatos, conejos y bovinos.

Otros autores distinguen tres tipos de colonias al usar el estereomicroscopio con luz transmitida oblicuamente: las iridiscentes, las azules y las intermedias.

Características bioquímicas

Metabolizan la glucosa por fermentación con producción de ácido, pero no de gas. Se utiliza el medio de Hugh y Leifson para demostrar su metabolismo fermentativo. Dan positiva la reacción de oxidasa y producen enzimas nitratorreductasas. Las reacciones bioquímicas más usadas para la separación de *Pasteurella* incluyen descarboxilación de la ornitina, producción de indol, reacción de la catalasa, ataque a la urea y producción de ácido a partir de la maltosa, manitol, dulcitol, sorbitol, arabinosa y trehalosa. Fermentación de maltosa y glicerol para cepas de *P. multocida ssp multocida* y *P. multocida ssp séptica*.

Factores patogénicos

Los factores de virulencia de *P. multocida* estarían asociados a sustancias tóxicas. La endotoxina (LPS) y la cápsula citotóxica estarían asociadas como factores patogénicos (Linzitto, 2007).

3.5.6.- *Chlamydia spp*

Las clamidias son un grupo especial de bacterias. Poseen ADN y ARN, ribosomas similares a los de las bacterias Gram negativas y pared celular, pero tienen un ciclo vital peculiar, que transcurre en buena parte en el interior de las células (Roca, 2007). Estos organismos carecen de los mecanismos para la producción de energía metabólica y no pueden sintetizar ATP. Esto las limita a una existencia intracelular, donde la célula hospedadora elabora productos intermedios con abundante energía. Por lo tanto, las clamidias son parásitos intracelulares estrictos. Las clamidias necesitan un ambiente intracelular porque no pueden sintetizar ATP y dependen de la célula hospedadora para satisfacer sus necesidades energéticas. Las clamidias crecen en cultivos de diversas líneas de células eucariotas. Con frecuencia se utilizan células de McCoy tratadas con cicloheximida para cultivar clamidias; *C. pneumoniae* crece mejor en células HL o HEp-2. Todas las variedades de clamidia proliferan en embriones de huevo, en particular en el saco vitelino (Brooks *et al.*,

2011) . La Chlamydia ha sido aislada mediante hisopados conjuntivales de terneros y búfalos con queratoconjuntivitis. Queratoconjuntivitis aguda ha sido inducida en terneros mediante la inoculación de Chlamydias en saco conjuntival (Odeón *et al.*, 2012).

Morfología y características generales

La morfología en las clamidias es variable, dependiendo del ciclo evolutivo. Esto implica poder observar dos formas de presentación del microorganismo netamente diferentes. El cuerpo elemental, forma adaptada a la supervivencia extracelular, infectante y metabólicamente inactiva, se caracteriza por presentar un tamaño de aproximadamente 0,3 μm , pared celular rígida con subunidades dispuestas en forma hexagonal resistente a la sonicación y a la tripsina, contenido de RNA y DNA en una proporción 1:1 y ser toxico para los ratones.

El cuerpo reticulado o inicial propio de la multiplicación intracelular no infeccioso y metabólicamente activo presenta un tamaño que oscila entre 0,5 y 1 μm , pared celular frágil sin subunidades en la cubierta, sensible a la sonicación, factible de ser lisado por la tripsina y permeable a las macromoléculas, contenido de RNA y DNA igual a 3:1 y no siendo toxico para los ratones.

La lisozima no tiene efecto sobre las paredes celulares de las clamidias. Al parecer estas carecen de ácido N-acetil murámico.

Las clamidias son desde el punto de vista antigénico muy complejas. Poseen una lipoglicoproteína específica de género común a todas ellas que contiene un ácido polisacárido antigénicamente determinante (2 ceto-3 desoxiotanoico) termoestable, estable frente al fenol al 0,5% soluble en éter y lauril sulfato de sodio y resistente a distintas enzimas (tripsina, quimiotripsina y papaína). Este complejo antigénico puede ser separado en varias fracciones por cromatografía e intercambio iónico y otros antígenos proteicos por PAGE.

Dentro de los componentes proteicos, resalta por su importancia como determinante antigénico de grupo, el correspondiente a la membrana proteica externa mayor de estos microorganismos.

Las toxinas de las clamidias se pueden demostrar por inoculación intravenosa en ratones con cultivos frescos recién cosechados de saco vitelino de huevo embrionado, relacionándose con componentes de la pared celular siendo neutralizadas por antisueros específicos.

Patogénesis

Una vez ingresados por las diferentes vías, los microorganismos fagocitados no recubiertos por las opsoninas escapan a la acción enzimática de lisozimas-

fagosomas y no son eliminados, pudiendo en efecto multiplicarse dentro del macrófago.

Las linfoquinas producidas por los linfocitos activados causan una microbiostasis de las clamidias en macrófagos activados. Este fenómeno va desapareciendo entre 24 y 41 horas si no se proporcionan nuevamente linfoquinas frescas.

Algunos investigadores demostraron que la *C. psittaci* deprime la transformación de los linfocitos. En el mecanismo intervendría un componente termoestable de la envoltura de los cuerpos elementales tanto viables como no viables; este componente no será inactivado por anticuerpos seroneutralizantes. En estos estudios no pudo demostrarse la presencia de linfocitos T supresores. La respuesta a los linfocitos vuelve a su normalidad después de 4 semanas.

La patogenia de la neumonía clamidial en bovinos y ovinos debe ser vista en relación con la infección intestinal muy común en la forma inaparente de ambas especies. Algunos autores reportan el aislamiento simultaneo de microorganismos de los tractos respiratorio e intestinal en bovinos con neumonía. Estos microorganismos aislados del intestino de bovinos y ovinos causaron neumonía después de ser inoculados por vía intratraqueal. La virulencia, en general, esta aumentada cuando se realizan pasajes seriados entre animales en estrecho contacto (inhalación de polvo en partículas que contienen clamidias expulsadas como consecuencia de la tos).

Generalmente en condiciones naturales, se sospecha que la relación primaria de infección por clamidias puede estar complicada por infecciones secundarias.

Formas clínicas en rumiantes

Existen diferentes factores que influyen en las formas clínicas de la enfermedad ocular (en especial en bovinos y ovinos) como son la edad del animal, la virulencia de la cepa, la transferencia de anticuerpos en el calostro, el estrés, las prácticas de manejo, etc.

Infección ocular: Se manifiesta por conjuntivitis o queratoconjuntivitis generalmente de tipo catarral a menos que existan infecciones secundarias.

Infección respiratoria: Esta caracterizada principalmente por hipertermia, disnea, secreción nasal mucopurulenta y finalmente neumonía, muchas veces asociada a microorganismos de salida como *P. multocida* y *Manheimia (Pasteurella) hemolítica* (Caffarena et al., 2007).

3.5.7.- *Sreptococcus spp*

El género está integrado por un grupo grande de microorganismos que reúnen las siguientes características: forma esférica u ovoide con un tamaño entre 0,5 y 2 um de diámetro. Están agrupados de a pares o en cadenas. Son inmóviles y no

esporulados, y algunas especies pueden presentar capsula. Son grampositivos, anaerobios facultativos y requieren para su crecimiento medios ricos en nutrientes, siendo necesario en algunos casos incubarlos en atmosfera enriquecida con CO₂. Son quimiorganotrofos y presentan un metabolismo fermentativo sobre los hidratos de carbono con producción de ácido, pero no gas. Son catalasa negativos y muchas especies son hemolíticas.

Durante el trabajo de Torres en el año 2013 se aisló *Streptococcus pluranimalium* de ojos de animales con QIB pero solo en 2 de los 20 casos tratados durante la investigación.

Los *Streptococcus* son parásitos de los vertebrados y habitantes de la boca y el tracto respiratorio. Algunas especies son patógenas para el hombre y los animales.

Taxonomicamente integran la familia *Streptococcaceae* junto con el género *Lactococcus*.

Características de cultivo

Los estreptococos tienen requerimientos de crecimiento complejos, debido a la incapacidad de estos microorganismos de generar muchos de los aminoácidos y vitaminas que necesitan, aunque el grado de exigencia varía según las especies. Con respecto a los nutrientes, habitualmente se utilizan medios de cultivo a los que se les agrega sangre o suero. También se pueden emplear, según las necesidades, medios selectivos, que pueden contener sustancias inhibidoras.

En medios solidos crecen formando colonias muy pequeñas de bordes regulares, convexas, transparentes u opacas, con un diámetro de 0,5 a 2 mm. Las cepas productoras de capsula suelen dar colonias de tipo mucoide. Una misma cepa puede variar y mostrar colonias diferentes (*S. pyogenes* varia la morfología de sus colonias en función de la cantidad de proteína M producida). Son anaerobios facultativos, y se logra un mejor incremento en el crecimiento de algunas cepas cuando se somete el cultivo a una tensión reducida de O₂ o con un nivel elevado de CO₂.

Características metabólicas

Son quimiorganotrofos y tienen actividad fermentativa sobre los hidratos de carbono, generalmente hemoláctica y sin producción de gas.

En medios con sangre (preferentemente de oveja), los estreptococos pueden producir distintos tipos de hemolisis: hemolisis β que se caracteriza por una lisis total de los eritrocitos: hemolisis α , que es la que se manifiesta por una decoloración parcial alrededor de la colonia. La primera característica metabólica a ser evaluada frente a un coco grampositivo es la presencia de catalasa, enzima que descompone el peróxido de hidrogeno liberando oxigeno libre, y que los estreptococos no la presentan.

Mecanismos de patogenicidad (varía según las especies)

Hemolisinas: participan dos enzimas: 1) esteptolisina O, proteína de PM 60,000, que se inactiva en presencia de oxígeno y 2) estreptolisina S, proteína que permanece estable en presencia de oxígeno. Su producción es inducida por el suero y es el agente causal de las zonas hemolíticas alrededor de las colonias.

Proteína M: Es una molécula fibrilar con propiedades antifagocíticas que se encuentra localizada en la superficie de los estreptococos del grupo A (existen más de 80 serotipos diferentes). Esta proteína interfiere sobre el depósito de C3 del sistema complemento, en la superficie de la bacteria.

Ácido lipoteicoico: Componente celular que actúa mediando la adhesión de los estreptococos del grupo A en las células epiteliales.

Cápsula: Algunos estreptococos pueden formarla, variando su composición química según la especie. Otorga propiedades antifagocíticas (Denamiel, 2007).

3.5.8.- Vacuna contra QIB

La eficacia de la vacuna contra QIB depende de su composición antigénica. La misma debe presentar los serotipos piliados de las cepas de *M. bovis* prevalentes en la región. Los antígenos del pili son los determinantes de la inmunidad por lo que la optimización de los procesos de producción y conservación de los mismos aumentan la potencia antigénica de la vacuna. Asimismo, *M. bovis* elabora toxinas que se inactivan rápidamente, por lo que resulta difícil que las vacunas contengan altos títulos de esos antígenos.

Estas características y el agregado de un adyuvante, en general de tipo oleoso, junto a un óptimo esquema de vacunación, han permitido tener éxito en el control de esta enfermedad.

En base a los antecedentes se recomienda inmunizar con dos dosis de vacuna contra QIB a los terneros dependiendo del tipo de establecimiento donde se realice la vacunación (Zielinsk, 2005).

También se han desarrollado vacunas intranasales a partir de la citotoxina recombinante de *M. bovis* adyuvada con ácido poliacrílico, en estudios recientes, sugirió que esta vacunación producía cambios en las concentraciones de IgA específicas del antígeno ocular lo que significaba una alternativa a la vacunación parenteral de bovinos para la inmunoprofilaxis (Angelos, 2014).

De la misma manera se ha desarrollado una vacuna a partir de la citotoxina recombinante de *Moraxella bovoculi*, en un estudio del 2006 dio como resultado aumentos significativos en títulos neutralizadores de hemolisina en suero y puede modular el tipo de organismo cultivado de ojos ulcerados de terneros en rebaños en

los que existen *M. bovis* y *M. bovoculi*. El uso de antígenos de *M. bovoculi* solos en vacunas para prevenir la IBK puede no ser beneficioso en rebaños en los que QIB está asociado con *M. bovoculi* y *M. bovis* (Angelos et al., 2010).

Otras vacunas combinadas se emplean para prevenir problemas respiratorios y oculares causados por virus y bacterias del complejo respiratorio bovino (HVB-1, virus de DVB, virus de Parainfluenza tipo 3, *P. multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Histophilus somni*) (Zielinsk, 2005).

4.- Hipótesis

Diversos géneros y especies bacterianas están implicados en Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina.

5.- Objetivos

5.1.- Objetivo general

Este trabajo tiene como objetivo realizar un estudio microbiológico de la QIB en un establo de la Región Lagunera, con el fin de identificar y caracterizar cepas que estén asociadas al desarrollo de la enfermedad.

5.2.- Objetivos específicos

- Aislar microorganismos de ojos de bovinos afectados por QIB en un establo de la Región Lagunera.
- Observar su crecimiento en distintos medios de cultivo para obtener el crecimiento de colonias.
- Identificar las cepas bacterianas aisladas, de acuerdo a sus características microscópicas, macroscópicas, de crecimiento y de sus requerimientos metabólicos por medio de pruebas bioquímicas.

6.- Materiales y métodos

- Hisopos estériles
- Medio de transporte Stuart
- Cajas Petri dobles
- Agar para métodos estándar de la marca BD® (Becton, Dickinson and Company)
- Agar eosina y azul de metileno de la marca BD®
- Base agar gelosa sangre de la marca BD®
- Sangre equina
- Jeringa de 50 ml
- Perlas de vidrio para desfibrinar

- Agua destilada
- Matraz Erlenmeyer de 1 litro
- Asas bacteriológicas
- Mechero
- Pipeta de 10 ml
- Hierro y triple azúcar (TSI) de la empresa DIBICO®
- Medio MIO de BD®
- Tubos de ensayo con tapa rosca de 10 ml
- Contador de colonias
- Autoclave

6.1.- Localización

El estudio se realizó en Torreón Coahuila, las muestras fueron recolectadas del establo La partida con coordenadas 25.580661, -103.313456 , ubicado en el ejido con el mismo nombre.

6.2.- Selección de animales

Las muestras fueron tomadas de 36 becerros que presentaban signos iniciales de la enfermedad, como puede ser lagrimeo profuso, fotofobia y ligero blefaroespasma, estos animales no tenían más de 2 semanas de haber nacido.

6.3.- Técnica de toma de muestra

Se usaron hisopos estériles para tomar la muestra y medio de transporte Stuart para la preservación y el transporte de la misma. La técnica que se usó consistía en frotar el hisopo sobre la conjuntiva del ojo para después colocar el hisopo en el medio de transporte.

Se logró recolectar 36 muestras las cuales fueron llevadas al Laboratorio de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) Unidad Laguna ubicado en Periférico Raúl López Sánchez y carretera Santa Fe con coordenadas 25.555100.-103.374102.

6.4.- Preparación de medios de cultivo, TSI y MIO

Los medios de cultivo (Agar para métodos estándar, EMB y base agar gelosa sangre) fueron preparados en un litro de agua destilada, en un matraz de Erlenmeyer, la solución se puso a calentar a la vez que se mezclaba, hasta lograr que el medio quedara completamente disuelto y se dejó hasta que hirviera por un minuto. Posteriormente se procedió a esterilizar el medio a 15 libras de presión durante 15 minutos en autoclave, al finalizar el proceso, se dejó enfriar el medio hasta llegar a una temperatura donde pudiera ser manipulable. En el caso de la base de gelosa sangre, se le añadió 50 ml de sangre equina, lo correspondiente a un 5 %. Los distintos medios fueron vertidos en cajas petri dobles, hasta lograr 36 preparaciones de cada uno, y por último se dejaron enfriar hasta que se solidificó el medio y posteriormente se puso a enfriar durante 24 horas a una temperatura de 4c.

En preparación de los medios TSI y MIO, se siguió casi el mismo procedimiento, solo con la diferencia de que solo se prepararon 250 ml de cada uno y al finalizar fueron vertidos en tubos de ensayo con tapa rosca de 10 ml, los tubos con el medio TSI se dejó enfriando de manera horizontal pero manteniendo un Angulo de 10 grados mientras que los tubos con medio MIO se dejó reposando de manera vertical en gradillas, al solidificarse se guardaron en un refrigerador a una temperatura de 5c durante 24 horas.

6.5.- Técnica de aislamiento

Cada una de las muestras se cultivó en medio de agar gelosa sangre, EMB y agar para métodos estándar, todos ellos de la empresa BD® (Becton, Dickinson and Company) usando la técnica de aislamiento por estría cruzada, se dejó incubando por 24 horas para poder observar crecimiento de colonias. La principal fuente bibliográfica que se usó para apoyarnos fue el libro de “Microbiología veterinaria del editor Nestor Oscar Stanchi”

6.6.- Selección de colonias

Al ver una gran variedad de colonias en los distintos medios, se tomó muy en cuenta su morfología macroscópica y microscópica, y la presencia de hemólisis en medio gelosa sangre, esto muy común en colonias de *Moraxella spp*

En cuanto a su morfología microscópica, las colonias fueron teñidas mediante tinción de gram, donde se buscó identificar si eran bacterias Gram negativas o positivas, al igual que la forma de la bacteria (cocos, bacilos, coco bacilos, etc.).

Una vez tenidas las colonias apropiadas, se les corrieron pruebas bioquímicas para poder conocer más sobre su metabolismo y así acercarnos a la identificación de los agentes que se buscaban.

6.7.- Técnica para siembra en medio TSI

Se utilizó una aguja estéril para tomar una muestra de la colonia, y esta fue sembrada mediante punción en el medio y por estrías en la superficie del mismo, se dejó incubando durante 24 horas para después realizar una interpretación de los cambios observados en el medio.

Donde un cambio de color amarillo del medio, nos diría que la bacteria es fermentadora de azúcar, este un parámetro importante para la identificación de los agentes.

6.8.- Técnica para siembra en medio MIO

Se utilizó una aguja estéril para tomar una muestra de la colonia, esta fue sembrada mediante una punción vertical en el medio, se dejó incubando durante 24 horas y posteriormente se hizo lectura a los cambios vistos en el medio.

La presencia de turbidez en el medio nos indicaría que la bacteria tiene una motilidad positiva.

6.9.- Prueba catalasa

Con un asa estéril se tomó una colonia y se colocó en un portaobjetos, después se agregó una gota de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) sobre la colonia y se hizo una ligera mezcla, donde un resultado positivo ocasionaría la formación de burbujas.

7.- Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en los cuadros 1 y 2.

En un total de 149 muestras, 98 presentaron cultivos puros y en las otras hubo mezclas de microorganismos según se aprecia en el cuadro 1

CUADRO 1.- Número de microorganismos aislados por muestra

	Número de muestras	Porcentaje del total
Muestras con un solo tipo de bacteria	98	66
Muestras con dos o más tipos de bacterias	51	34
De las muestras que obtuvieron un solo tipo de bacteria, la bacteria predominante fue <i>Moraxella spp.</i>		

De todas las colonias bacterianas que se obtuvieron, se logró identificar 5 géneros de bacterias distintas, según se aprecia en el cuadro 2.

CUADRO 2.- Géneros bacterianos aislados de las 149 muestras

Genero bacteriano	No. Casos	Porcentaje
<i>Staphylococcus spp</i>	21	36.2
<i>Moraxella spp</i>	13	22.4
<i>Streptococcus spp</i>	12	20.68
<i>Pseudomonas spp</i>	8	13.7
<i>Pasteurella spp</i>	4	6.9

8.- Discusión

En la literatura se menciona que no solo *M. bovis* actúa como patógeno en los brotes de la QIB, sino que diversos agentes han sido aislados de ojos de animales enfermos, entre los más importantes podemos mencionar: *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Pasteurella spp*, *Chlamydia spp* y *Mycoplasma spp* (Alexander, 2010; Blood et al., 1992). Esto fue confirmado por nosotros en las muestras trabajadas, ya que en el cuadro 2 se aprecia que identificamos cinco géneros diferentes, donde la mayoría se encontraba en cultivos puros (cuadro1) y predominando los cultivos de *Moraxella spp*.

En el presente trabajo se quiso dar a conocer información importante sobre estos agentes, como es su poder patógeno y su papel dentro de la patogénesis de QIB, su aislamiento y parámetros a tomar en cuenta a la hora de identificarlos.

Los géneros que con mayor frecuencia se encontraron como secundarios fueron *Streptococcus spp* y *Staphylococcus spp*, esto puede ser muestra de que estos patógenos están estrechamente asociados a *Moraxella* u otros agentes principales, pero también hay que mencionar que pueden ser patógenos oportunistas, una vez que se dan las condiciones apropiadas para su crecimiento.

Las muestras fueron obtenidas tomando todas las precauciones para evitar una sobre contaminación, pero son muestras de campo en donde las condiciones no permiten tener un ambiente estéril y una contaminación ambiental es muy posible.

En cuanto a *Chlamydia spp* y *Mycoplasma spp* (Agentes que se han asociado a QIB) no fue posible aislarlos debido a sus altos requerimientos nutritivos, una alta sensibilidad de las condiciones de transporte, incubación y un lento desarrollo por lo que un estudio complementario teniendo los materiales y el quipo apropiado nos permitiría conocer si estos agentes se encuentran en nuestra región, por lo que hasta ahora es una incógnita o por lo menos no se encontró información que lo demostrara.

Debido a ciertas condiciones no se pudo identificar a que especie del genero *Moraxella* pertenecían las colonias encontradas, aun así, es importante mencionar que gracias a la información recabada se sabe que por lo regular se trata de *M. bovis*, *M. bovoculli* y *M. ovis*, por lo que si se busca una mejor prevención habría que buscar vacunas que contengan antígenos y toxinas de estas tres especies y si en un futuro se logra aislar *Mycoplasma spp* en la región, habría que pensar también en una vacuna contra este agente ya que está demostrado que tiene un importante papel en el inicio de la enfermedad.

9.- Conclusión

Al realizar esta investigación se tomó en cuenta el impacto que tiene la enfermedad a nivel mundial y dentro del mismo estable en el que se tomaron las muestras, ya que se considera una enfermedad causante de considerables pérdidas en producción tanto en ganado de leche como de carne donde por lo regular los tratamientos médicos no suelen ser rentables.

En la actualidad ya no se ve a *M. bovis* como único agente causal de la enfermedad y cada vez las investigaciones se centran en conocer la variedad etiológica y su posible papel dentro de la patogénesis. Es por esto que toma mayor fuerza el aislamiento e identificación de los agentes una vez que se observan los primeros signos de la enfermedad dentro del hato, ya que con esto se pueden realizar tratamientos más específicos y medidas preventivas apropiadas a la variedad etiológica presente en el estable.

Siempre es importante mencionar que, para lograr un correcto aislamiento de los agentes, se debe seguir un protocolo adecuado desde que se toman las muestras en donde se intenta realizarla de la manera más aséptica posible y hasta la selección de los medios de cultivo y pruebas bioquímicas apropiados para identificar cada agente, a la hora de la siembra es donde también toma gran importancia las medidas para evitar la contaminación de los cultivos, ya que al haber crecimiento de bacterias ambientales suelen afectar el desarrollo de los agentes que se están buscando aislar. Todo esto para lograr tener resultados confiables y que nos ayuden a tomar una decisión a la hora de enfrentar o prevenir esta enfermedad.

En nuestro presente trabajo comprobamos que *Moraxella spp* es una de las causas principales de la QIB, en el establo muestreado y que esta se encuentra asociada a otros microorganismos.

En el establo donde se tomaron las muestras se tenían muy pocas medidas en el control de la mosca y de la bioseguridad en general, principalmente en el área de crianza (sujetos de los que se obtuvieron las muestras), por lo que estos rápidamente presentaban signos característicos (lagrimeo, edema conjuntival y blefaroespasmio). Esto causa que haya una alta diseminación de la enfermedad, y donde muy posiblemente con la implementación de las medidas apropiadas de higiene y control del vector, se podría bajar el índice de brotes en el establo.

10.- Literatura citada:

- Alexander, D. 2010. Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review of cases in clinical practice. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 26(3):487-503.
- Angelos, J., V. M. Lane, L. M. Ball y J. F. Hess. 2010. Recombinant moraxella bovoculi cytotoxin-iscom matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet Res Commun* 34(3):229-239.
- Angelos, J. e. a. 2014. Ocular immune responses in steers following intranasal vaccination with recombinant moraxella bovis cytotoxin adjuvanted with polyacrylic acid. *Clin Vaccine Immunol* 21(2):181-187.
- Blood, D. C., O. M. Radostits y I. Begara Morillas. 1992. *Medicina veterinaria: Libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino*. Interamericana : McGraw-Hill, México.
- Brooks, G., K. Carroll, J. Butel, S. Morse y T. Mietzner. 2011. Queratoconjunctivitis infecciosa bovina: Tipos de vacunas y su evaluación. Mc Grawhill, Mexico D. F.
- Brown, M., A. Brightman, F. B. y M. Rider. 1998. Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review. *J vet Intern Med* 12:259-266.
- Caffarena, R., H. Trenchi y F. Capano. 2007. Chlamydia. En: N. M. Stanchi, P. Gentilini, E. Reinoso, E. Echeverria, M. Leardini, N. Copes, J. (ed.) *Microbiología veterinaria*. p 356-361. Inter-Medica, Buenos Aires, Argentina.
- Carmo, P., A. Vargas, D. Rissi, J. Oliveira-Filho, F. Pierezan, R. Lucena, F. Leivas y C. Barros. 2011. Surto de ceratoconjunctivite infecciosa bovina e hemonose causando mortalidade em bezerros. *Vet Bras* 31:374-378.
- Cerda, R. 2007. Micoplasmas. En: N. M. Stanchi, P. Gentilini, E. Reinoso, E. Echeverria, M. Leardini, N. Copes, J. (ed.) *Microbiología veterinaria*. p 313-317. Inter-Medica, Buenos Aires, Argentina.

- Denamiel, G. 2007. Estreptococos. En: N. M. Stanchi, P. Gentilini, E. Reinoso, E. Echeverria, M. Leardini, N. Copes, J. (ed.) Microbiologia veterinaria. p 179-185. Inter-Medica, Buenos Aires, Argentina.
- Farias, L. D., G. Maboni, L. B. Matter, C. F. Scherer, F. Libardoni y A. C. de Vargas. 2015. Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3' region of rtxa gene from geographically diverse strains of moraxella bovis, moraxella bovoculi and moraxella ovis. Vet Microbiol 178(3-4):283-287.
- Furmanek-Blaszczak, B., N. Kurpiewska, R. Boratynski y M. Sektas. 2013. Molecular characterization of plasmid pmbo4.6 of moraxella bovis atcc 10900. Curr Microbiol 66(3):205-213.
- Gentilini, E. 2007a. Estafilococos. En: N. M. Stanchi, P. Gentilini, E. Reinoso, E. Echeverria, M. Leardini, N. Copes, J. (ed.) Microbiologia veterinaria. p 190-194. Inter-Medica, Buenos Aires, Argentina.
- Gentilini, E. 2007b. Pseudomonas. En: N. M. Stanchi, P. Gentilini, E. Reinoso, E. Echeverria, M. Leardini, N. Copes, J. (ed.) Microbiologia veterinaria. p 235-238. Inter-Medica, Buenos Aires, Argentina.
- Kowalski, A., G. Maboni, L. Gressler, J. Espindola, C. Balzan, C. Tasca, J. Guizzo, F. Conceicao, R. Frandoloso y A. de Vargas. 2017. Antigenic characterization of moraxella bovis, moraxella bovoculi and moraxella ovis strains with potential use in vaccines. Veterinary Microbiology 21056-63.
- Leardini, N. 2007. Moraxella. En: N. M. Stanchi, P. Gentilini, E. Reinoso, E. Echeverria, M. Leardini, N. Copes, J. (ed.) Microbiologia veterinaria. p 336-338. Inter-Medica, Buenos Aires, Argentina.
- Leviosohn, S., S. Garazi, I. Gerchman y J. Brenner. 2004. Diagnosis of a mixed mycoplasma infection associated with a severe outbreak of bovine pinkeye in young calves. J vet. diagn Invest 16579-581.
- Linzitto, O. 2007. Pasteurella. En: N. M. Stanchi, P. Gentilini, E. Reinoso, E. Echeverria, M. Leardini, N. Copes, J. (ed.) Microbiologia veterinaria. Inter Medica, Buenos Aires, Argentina.
- Madigan, M., J. Martinko, P. Dunlap y D. Clark. 2009. Brock biología de los microorganismos. Addison Wesley, Madrid España.
- Martínez, F., G. Flores, A. Neri y F. Alarcón. 2000. Control de un brote de queratoconjuntivitis infecciosa bovina mediante el control de las moscas en estado larvario. Med Vet 17(11):273-276.
- Minatel, L. y C. Corbellini. 2007. Efecto de la deficiencia de cobre sobre el desarrollo de queratoconjuntivitis infecciosa bovina en terneros desafiados experimentalmente con moraxella bovis. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- O'Connor, A. M., H. G. Shen, C. Wang y T. Opriessnig. 2012. Descriptive epidemiology of moraxella bovis, moraxella bovoculi and moraxella ovis in beef calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjuntivitis (pinkeye). Vet Microbiol 155(2-4):374-380.
- Odeón, A., F. Paolicchi, G. Combessies y J. Margueritte. 2012. Queratoconjuntivitis infecciosa bovina (qib).
- Prieto, C., D. Serra, P. Martina, M. Jacobs, A. Bosch y O. Yantorno. 2013. Evaluation of biofilm-forming capacity of moraxella bovis, the primary causative agent of infectious bovine keratoconjuntivitis. Veterinary Microbiology 166(3-4):504-515.
- Pugh, G. y T. McDonald. 1986. Identification of bovine carriers of moraxella bovis by comparative cultural examination of ocular and nasal secretions. Am J Vet Res 472343-2347.
- Roca, B. 2007. Infecciones por clamidias. Anales de Medicina Interna 24(6).
- Rochedo, F. y T., C. 2003. Moraxella bovis: Influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. Ciencia Rural 33(4):779-788.
- Smith, B. P. 2015. Large animal internal medicine. ELSEVIER, California, United States.

- Torres, V. S. 2013. Bases microbiológicas de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina en Uruguay. Doctorado, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo Uruguay.
- Turquieto, E., R. Chayer, M. Jorge y J. Passucci. 2008. Queratoconjuntivitis bovina actualización y análisis de casos entre 2002 y 2006 en Argentina. p 1-12, Buenos Aires, Argentina.
- William, C. 1995. Enfermedades del ganado vacuno lechero. Acribia, Zaragoza, España.
- Zielinsk, G. y P., H. . 2005. Control de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina. p 1-19. Sitio Argentino de Producción Animal, Argentina.