

FECHA DE ADQUISICIÓN	
NUM. DE INVENTARIO	00309
PROCEDENCIA	
NUM. CALIFICACIÓN	
PRECIO	
DIST.	



00309

SF961
.F56
2006
TESIS
Ej.1

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**MICROBIOLOGIA DE LAS LESIONES DE PULMONES
NEUMONICOS PRODUCIDAS POR BACTERIAS, EN
BOVINOS HOLSTEIN SACRIFICADOS EN EL RASTRO
MUNICIPAL DE GOMEZ PALACIO, DGO.**

POR:

JESSICA MARIA FLORES SALAS

T E S I S

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAH., MÉXICO

MAYO DE 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**MICROBIOLOGIA DE LAS LESIONES DE PULMONES NEUMONICOS
PRODUCIDAS POR BACTERIAS, EN BOVINOS HOLSTEIN SACRIFICADOS
EN EL RASTRO MUNICIPAL DE GOMEZ PALACIO, DGO.**

T E S I S

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JESSICA MARIA FLORES SALAS

ASESOR

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COLABORADOR

DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA.

COLABORADOR

M.C. CARLOS JULIO JARAMILLO ARANGO

COLABORADOR

M.C. FRANCISCO AGUILAR ROMERO

TORREÓN, COAH., MÉXICO

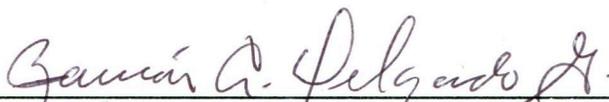
MAYO DE 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

MICROBIOLOGIA DE LAS LESIONES DE PULMONES
NEUMONICOS PRODUCIDAS POR BACTERIAS, EN
BOVINOS HOLSTEIN SACRIFICADOS EN EL RASTRO
MUNICIPAL DE GOMEZ PALACIO, DGO.



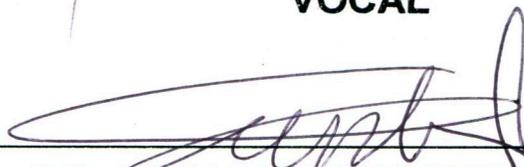
M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
PRESIDENTE



M.V.Z. JOSÉ GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
VOCAL



M.V.Z. JESÚS ALFONSO AMAYA GONZÁLEZ
VOCAL



DR. GERARDO DUARTE MORENO
VOCAL SUPLENTE

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por haberme dado salud y fuerzas para no abandonar este reto que es parte de la vida.

A mis Padres:

Que con esfuerzo y paciencia me apoyaron incondicionalmente siempre.

A mi Alma Terra Mater:

Por haberme formado con bases para ser un ser humano capaz de sobresalir en el camino del saber, por formar un profesional que luchara contra adversidades de la vida.

A mis Hermanos:

Por ser una buena familia y acompañarme en esta gran carrera que ha llegado a su meta satisfactoriamente.

A mis Asesores:

M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González.

M.C. Carlos J. Jaramillo Arango.

Al Dr. Francisco José Trigo Tavera y Dr. Francisco Aguilar Romero, por habernos invitado a formar parte del proyecto.

Agradecimientos al apoyo de CONACYT por el financiamiento con el Proyecto G-3859-B, a cargo del Dr. Francisco José Trigo Tavera.

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Maria Salas Nevarez.

Mario Flores Reyes.

A mis Hermanos:

Claudia A. Flores Salas.

Ulises O. Flores Salas.

Emara M. Flores Salas.

Guadalupe Flores Salas.

Resumen

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, prospectivo y transversal, en el rastro Municipal de Gómez Palacio, Durango, donde se inspeccionaron 550 pulmones de bovinos Holstein, en el periodo otoño a invierno. El muestreo se realizó en forma dirigida logrando obtener 68 (12.36%) pulmones con lesiones neumónicas. Las 68 muestras se cultivaron en Agar sangre, se procesaron en la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, y en el Departamento de Fisiopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Palo Alto, Cd. de México, con la finalidad de determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. Del total de muestras cultivadas, se obtuvieron 20 (29.41%) aislamientos de bacterias Gram negativas. A estas se les realizaron pruebas bioquímicas, para diferenciar entre *M. haemolytica* y *P. multocida*. Las pruebas bioquímicas determinaron que de las 20 muestras, 9 (45%) presentaron *Mannheimia haemolytica*, 9 (45%) *Pasteurella multocida* y 2 (10%) casos con una asociación de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. Se discuten los hallazgos con otros investigadores y se hacen sugerencias con respecto a futuros estudios en la Comarca Lagunera.

INDICE DE CONTENIDO

Página

Agradecimientos	i
Dedicatorias.	ii
Resumen.	iii
I. Introducción.	1
II. Antecedentes.	3
2.1. Clasificación de los géneros de <i>Pasteurella</i> y <i>Mannheimia</i> .	3
2.1.1. <i>Pasteurella multocida</i> .	3
2.1.2. <i>Mannheimia haemolytica</i> .	4
2.2. Signos y lesiones producidos por <i>Pasteurella multocida</i> .	5
2.3. Signos y lesiones producidos por <i>Mannheimia haemolytica</i> .	5
2.4. Diagnóstico.	6
2.4.1. Métodos de aislamiento e identificación.	6
2.4.2. Métodos de tipificación.	7
2.4.2.1. Fenotipificación.	7
2.4.2.2. Serotipificación.	7
2.4.2.3. Genotipificación.	8
2.5. Patogenicidad y virulencia.	8
2.5.1. Determinantes de la virulencia.	11
2.5.1.1. La cápsula.	11
2.5.1.2. Proteínas de la membrana externa.	11
2.5.1.3. Leucotoxinas.	12
2.5.1.4. Neuraminidasa.	13
2.5.1.5. Sialidasa.	13
III. Justificación.	14
IV. Objetivos.	15
4.1. Objetivo General.	15
4.2. Objetivos específicos.	15
V. Material y Métodos.	16

5.1. Preparación de agar sangre para medio de cultivo.	16
5.1.1. Material.	16
5.1.2. Procedimiento.	17
5.2. Técnica de siembra en medios de cultivo para la identificación de colonias de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i>.	17
5.3. Técnica para la realización de frotis de los aislamientos obtenidos.	17
5.3.1. Material.	17
5.3.2. Procedimiento.	18
5.4. Procedimiento para la tinción de Gram modificada de Reed.	18
5.5. Procedimiento para la preparación de las pruebas bioquímicas.	19
5.5.1. Oxidasa (método de Kovacs).	19
5.5.1.1. Medios y reactivos.	19
5.5.1.2. Mecanismo.	19
5.5.1.3. Interpretación de resultados.	19
5.5.2. Citrato de Simons.	19
5.5.2.1. Objetivo.	19
5.5.2.2. Medios y reactivos.	20
5.5.2.3. Mecanismo.	20
5.5.2.4. interpretación de resultados.	20
5.5.3. Producción de indol.	20
5.5.3.1. Aplicación.	20
5.5.3.2. Medios y reactivos.	20
5.5.3.3. Mecanismo.	20
5.5.3.4. Método de siembra e incubación.	20
5.5.4. Triple azúcar hierro (TSI).	21

5.5.4.1. Objetivo.	21
5.5.4.2. Medios y reactivos.	21
5.5.4.3. Mecanismo.	21
5.5.4.4. Método de siembra.	22
5.5.5. Urea.	22
5.5.5.1. Aplicación.	22
5.5.5.2. Objetivo.	23
5.5.5.3. Medios y reactivos.	23
5.5.5.4. Mecanismo.	23
VI. Resultados.	24
6.1. Evidencias patológicas.	24
6.2. Identificación de las bacterias.	24
6.3. Resultados de las pruebas bioquímicas.	25
VII. Discusión.	27
VIII. Conclusión y recomendaciones.	30
IX. Literatura citada.	31

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación entre los géneros <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i>.	25
Cuadro 2. Aislamientos de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en muestras de pulmones neumónicos del rastro de Gómez Palacio, Dgo.	26

I. Introducción

La producción bovina se ve afectada en su eficiencia y eficacia productiva por diversos factores, entre los cuales se encuentran las enfermedades infecciosas y de ellas los problemas respiratorios representan grandes pérdidas económicas a nivel mundial (Argueta, 1988; Pijoan, 1999; Juárez, 2001).

Los agentes etiológicos involucrados en las neumonías pueden ser virus, bacterias, además de sinergismos virus-bacterias (Morales, 1993; Juárez, 2001; Callan, 2002). Dentro de los agentes bacterianos comúnmente involucrados se encuentran: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*, así como también se han identificado micoplasmas (Trigo, 1991; Morales *et al.*, 1993; Juárez, 2001; Callan, 2002).

Estos microorganismos son comensales habituales del tracto respiratorio superior de los rumiantes domésticos y silvestres, aunque llegan a estar presentes en casos de enfermedades respiratorias, hay variaciones entre las diferentes cepas en su capacidad para producir enfermedad en los diferentes hospedadores animales (Trigo, 1987).

La capacidad de estos microorganismos para producir pérdidas económicas, depende de los factores de manejo asociados con la mortalidad de los animales, de aquí la importancia de estudiar a estos agentes los cuales son muy comunes pero son pocos los estudios que confirmen la severidad del problema (Pijoan y Aguilar, 2000).

En la Comarca Lagunera no se encontraron estudios que presenten aislamientos de las bacterias involucradas en el complejo respiratorio bovino, en muestras tomadas de rastro. Por lo tanto, la presente

investigación tiene por objetivo identificar la frecuencia de aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, a partir de pulmones neumónicos colectados en el rastro municipal de Gómez Palacio, Durango.

II. Antecedentes

2.1. Clasificación de los géneros de *Pasteurella* y *Mannheimia*

Normalmente se aíslan bacterias que pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* de diferentes especies de animales, incluyendo a los caballos, y la mayoría se consideran como comensales o patógenos oportunistas. A la fecha nueve géneros (*Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Lonepinella*, *Phocoenobacter*, *Histophilus*, *Gallibacterium* y *Volucribacter*) están dentro de la familia *Pasteurellaceae* (Kuhnert *et al.*, 2004).

2.1.1. *Pasteurella multocida*

La *Pasteurella multocida* es un patógeno primario o secundario y es responsable para una gama amplia de enfermedades económicamente importantes en los animales domésticos a lo largo del mundo. La *Pasteurella multocida* es considerada como la causante de la neumonía enzoótica en animales domésticos, incluyendo a los becerros (Kiorpes, *et al.*, 1988). Ésta bacteria es un pequeño cocobacilo no móvil Gram negativo que se encuentra en el tracto nasofaríngeo y el gastrointestinal de muchos animales salvajes, domésticos, mamíferos y aves (Davies, 2004). No produce a menudo ninguna enfermedad en sus hospedadores animales. El tracto respiratorio es el segundo sitio más común de infección por *Pasteurella*, donde puede manifestarse con neumonía, traqueobronquitis, abscesos o enfisema. Éste organismo también puede causar las infecciones respiratorias superiores como la sinusitis y faringitis. En los humanos la mayoría de las lesiones son celulitis y abscesos superficiales localizados, que le siguen de una mordedura o arañazo de un animal. (Chen *et al.*, 2002).

2.1.2. *Mannheimia haemolytica*

En 1921, Jones informó de tres grupos de *Pasteurella* en bovinos y las cepas atípicas fueron ubicadas en un grupo llamado "*Bacillus bovisepiticus*". Estas cepas se caracterizaron después por Newsom y Cross en 1932, quienes propusieron el nombre de *Pasteurella haemolytica* para el grupo *Bacillus bovisepiticus* (Angen *et al.*, 1999).

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica es el agente etiológico de pasteurelosis neumónica del ganado bovino y ovino, produciendo infecciones que causan considerables pérdidas económicas (Davies, *et al.*, 1996).

Dos biotipos de *Pasteurella haemolytica* fueron descritos por Smith en 1961 basados en varios caracteres fenotípicos así como las diferencias patológicas y epidemiológicas. Los biotipos fueron designados A y T que se refiere a su habilidad de fermentar arabinosa o trealosa, respectivamente. Y un tercer grupo de *Pasteurella haemolytica* fue propuesto por Frederiksen en 1973 para cepas que no estaban dentro de los primeros biotipos A y T. Un sistema de pruebas de serotipificación por hemoaglutinación indirecta (IHA), fue utilizado para diferenciar los serotipos. Los serotipos 3, 4, 10 y 15 estaban asociados con el biotipo T, y los serotipos restantes con el biotipo A (Angen *et al.*, 1999).

En la creación del género *Mannheimia*, un total de cinco nuevas especies fueron reconocidas, *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. ruminalis* y *M. varigena*. La cepa que se consideró una vez *Pasteurella haemolytica* trealosa negativo se reconoce ahora como *Mannheimia haemolytica*, específicamente, *Pasteurella haemolytica* serovariedades 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 y 16. Los aislamientos reconocidos una vez como *Pasteurella haemolytica* serovariedad 11 se han reclasificado como *Mannheimia glucosida* (Blackall *et al.*, 2001).

2.2. Signos y lesiones producidos por *Pasteurella multocida*

Las infecciones causadas por esta bacteria incluyen cólera en aves y pollos, rinitis atrófica progresiva en cerdos. Neumonía en bovinos, ovejas y cerdos, y septicemia hemorrágica en vacas y búfalos de agua en ciertas áreas enzoóticas de Asia y África (Davies *et al.*, 1996).

La fiebre de embarque ocurre frecuentemente entre el ganado después del transporte y se caracteriza por fiebre, disnea, lesiones pulmonares exudativas y necróticas (Storz *et al.*, 2000).

En la infección temprana, ocurre la entrada de neutrófilos, edema con fluido y fibrina en alvéolos, y en la superficie pleural, y acumulaciones en el septo interlobular. Otras lesiones que aparecen después incluyen hemorragia, trombosis vascular, necrosis coagulativa del parénquima, y formación de abscesos. Estas lesiones pulmonares que han ocurrido experimentalmente se han documentado en casos de infección natural (Yoo *et al.*, 1995).

2.3. Signos y lesiones producidos por *Mannheimia haemolytica*

Las lesiones características incluyen la inflamación aguda, con destrucción de colágena, infiltración de fibrina y entrada abundante de células inflamatorias en el pulmón. Estas lesiones inhiben el intercambio de aire adecuado y reducen la función del pulmón. *M. haemolytica* A1 sintetiza una variedad de factores de virulencia como la endotoxina del lipopolisacarido (LPS), la leucotoxina (Lkt), y la enzima O-sialoglycoproteasa, que le permiten colonizar el tracto respiratorio bajo (Blackall *et al.*, 2001).

2.4. Diagnóstico

2.4.1. Métodos de aislamiento e identificación

El diagnóstico definitivo se hace por identificación del agente causal en medios de cultivo de Agar sangre y con pruebas bioquímicas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas de identificación que permiten la diferenciación entre los géneros *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

Pruebas	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
Oxidasa	+	+
TSI	Reacción de acidez	Reacción de acidez
Motilidad	-	-
Glucosa	+	+
Hemólisis	+	-
Crecimiento en Agar Mac ConKey	+	-
Reducción de Nitratos	+	+
Indol	-	+
Urea	-	-

(Gutiérrez *et al.*, 2003)

Las colonias de *Pasteurella multocida* 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 (Gutiérrez *et al.*, 2003)

Los grupos A y D de *P. multocida* son reconocidos en México (Jaramillo, *et al.*, 1987), no así los grupos B y E, que se relacionan con septicemia hemorrágica, la cual posee antígenos somáticos implicados como causantes de la pasteurelosis en rumiantes salvajes (Townsend *et al.*, 1998; Kodjo *et al.*, 1999).

Dos biotipos de *Mannheimia haemolytica* fueron reconocidos tradicionalmente, el biotipo A consistió en aislamientos que fermentaban la arabinosa, y el biotipo T que consistió en aislamientos que fermentaban la trealosa (Blackall *et al.*, 2002).

2.4.2. Métodos de tipificación

2.4.2.1. Fenotipificación

Las colonias de *Pasteurella multocida* 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. En el caso de *Mannheimia haemolytica* las colonias son circulares, grisáceas, mas pequeñas que *Pasteurella multocida* y capaces de producir hemólisis completa que en ocasiones no es mas grande que la colonia y por lo tanto no es aparente a menos que se quite la colonia (Gutiérrez *et al.*, 2003).

2.4.2.2. Serotipificación

Se han usado varios métodos para la serotipificación de *Mannheimia haemolytica*. La prueba de aglutinación en tubo, usada para el examen de antígenos somáticos, no demostró ser práctica debido a las numerosas reacciones cruzadas. Actualmente se ha introducido la técnica de hemoaglutinación indirecta para este propósito, la técnica de hemoaglutinación indirecta se volvió el método más difundido para el examen de serotipos de *Mannheimia haemolytica* (Fodor *et al.*, 1996).

Al igual que los demás géneros de la familia, las especies de los géneros *Pasteurella* y *Mannheimia* cuentan con antígenos somáticos y capsulares. *Pasteurella multocida* se ha dividido en cinco tipos capsulares (grupos A, B, D, E y F) utilizando la técnica de hemoaglutinación indirecta (Kodjo *et al.*, 1999).

Se sugiere que los serotipos están relacionados con las diferentes cepas según el hospedador específico y la virulencia. Por ejemplo, el serotipo A1 y A6 están en todos los casos de pasteurelosis neumónica bovina, cuando por el contrario los serotipos A2 y A7 se aíslan con mayor frecuencia de enfermedades en las ovejas. También se ha demostrado que en bovinos y ovinos se ha aislado el mismo agente por ejemplo, serotipo A1, A2, o A6, y pueden ser distinguidos por las diferencias en el genotipo cromosómico (Davies *et al.*, 2001)

2.4.2.3. Genotipificación

La genotipificación esta basada en la caracterización de ADN del organismo por el análisis del ADN cromosómico o los plásmidos de ADN. Los métodos que han sido aplicados para la identificación cromosómica de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* incluyen el análisis de endonucleasas de restricción, ribotipificación y la reacción en cadena de la polimerasa (Pachificus, 2000).

2.5. Patogenicidad y virulencia

Debido a la asociación íntima de la mucosa respiratoria a las sustancias medio ambientales, existen mecanismos de defensa innatos, por lo menos en parte, para proteger al hospedador contra la colonización e

infección microbiana. Estos mecanismos incluyen el aparato mucociliar, proteínas surfactantes, los macrófagos alveolares y un epitelio intacto. Recientemente, varias clases de proteínas antimicrobiales y péptidos producidas por las células de la mucosa respiratoria cada vez más se ha apreciado debido a su contribución a la defensa innata contra los patógenos microbianos (Fales-Williams *et al.*, 2002).

Durante las infecciones por bacterias Gram negativas, la presencia de lipopolisacáridos (LPS) estimula el sistema inmunológico innato, por lo cual la respuesta inflamatoria juega un papel crítico ayudando a eliminar a las bacterias y prevenir infecciones. Esta respuesta inicial a bacterias Gram negativas puede despertar por numerosos componentes bacterianos, la mayoría tiene el lípido A, un componente potencial de la estructura del núcleo del LPS. Si la respuesta inflamatoria en el hospedador es incapaz de eliminar a las bacterias y la infección procede, permite la presencia de cantidades grandes de LPS sistémico esto puede producir un choque endotóxico, en el que hay una superproducción de mediadores de la inflamación que causan daño a los tejidos, choque séptico, fallo del organismo y muerte (Harper *et al.*, 2004). La migración y activación de neutrófilos en el tejido inflamado están reguladas por una red compleja de interacciones entre las citocinas, leucocitos, endotelio vascular, moléculas de adherencia celular, y los factores quimiotácticos solubles. Las citocinas inflamatorias, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina beta-1 (IL-1 β), e interleucina-8 (IL-8) juegan un papel central en la iniciación y dirección de estas interacciones. TNF α y IL-1 β son polipéptidos responsables primarios pleiotrópicos secretados por los monocitos y macrófagos en la respuesta al patógeno microbiano y otros estímulos. IL-8, un potente factor quimiotáctico activado por los neutrófilos, es una quimocina secretada por una variedad celular inmune y otro tipo celular no inmune, que incluye monocitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y neutrófilos (Malazdrewich *et al.*, 2001).

Durante el estado de enfermedad, *Mannheimia haemolytica* experimenta cambios dramáticos en su ambiente físico. Al inicio de la enfermedad, esta bacteria tiene una fase de crecimiento rápido. Las bacterias se inhalan entonces en el pulmón donde ellas encuentran un ambiente diferente al de la nasofaringe. Puede esperarse que las bacterias experimenten cambios en la temperatura, la concentración de oxígeno, y disponibilidad de nutrientes y moléculas como hierro. Además, las bacterias se enfrentan a la respuesta inmune del hospedador y la necesidad de elaborar defensas. Las variaciones en el microambiente de *Mannheimia haemolytica* pueden ser una señal para modular la expresión de la leucotoxina (Marciel *et al.*, 2001).

La movilización de neutrófilos no combate la infección eficazmente, y la degranulación y lisis de estos fagocitos provocan la liberación de productos perjudiciales que agravan el daño pulmonar (Wang *et al.*, 1998).

La adherencia de leucocitos circulantes en el endotelio microvascular es importante para transitar en los sitios de inflamación. Esta interacción depende parcialmente de la disponibilidad de moléculas de adherencia expresada por leucocitos y células del endotelio vascular (Radi *et al.*, 1999).

La virulencia de este fenotipo hemolítico está asociado a los rumiantes, pero el gen que confiere la hemólisis no se ha identificado. Entre las características de virulencia producidas por *Mannheimia haemolytica* que secreta la leucotoxina citolítica formadora de poros que tiene una susceptibilidad a células blanco, limitada a los leucocitos y plaquetas de rumiantes (Murphy, *et al.*, 1995).

2.5.1. Determinantes de la virulencia

Una forma de evaluación significativa de la infección de *Mannheimia haemolytica* ha sido determinar si la inmunización con proteínas daría resultados en protección para el desafío en la infección. Vacunas usadas en *Mannheimia haemolytica* sin el antígeno de leucotoxina han sido de eficacia variable (Chidambaram *et al.*, 1995).

2.5.1.1. La cápsula

Algunas características de los factores de virulencia incluyen una leucotoxina sialoglicoproteasa, neuraminidasa y proteínas agrupadas como transferrinas en la cápsula bacteriana (Lo *et al.*, 2001).

2.5.1.2. Proteínas de la membrana externa

Los LPS son un componente mayor de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, e interactúan fácilmente con numerosas biomoléculas incluyendo fosfolípidos, y proteínas de la membrana o del suero (Li, *et al.*, 1999).

Durante los períodos de crecimiento *in vitro*, se sueltan secciones grandes de la membrana exterior en el ambiente extracelular como vesículas membranosas o endotoxinas. El componente proteínico de endotoxinas, llamado proteína de la endotoxina o proteína LPS asociada (LAP), es heterogénea, contiene 12 proteínas, y varía en el tamaño de 10 a 35 kDa (Brogden *et al.*, 1995).

2.5.1.3. Leucotoxinas

La leucotoxina es un miembro de la familia genéticamente relacionada de las llamadas citolisinas bacterianas "repeat in toxin" (RTX; Federova *et al.*, 1997). La mayoría de las toxinas RTX interactúan con diferentes tipos de células de varias especies, pero la leucotoxina es específica de las células linfoides en rumiantes (Davies *et al.*, 2002).

El papel específico de la leucotoxina en la patogenia e infección de *Mannheimia haemolytica* en la neumonía bovina ha sido difícil de entender. Aunque la citotoxina ha demostrado los efectos ante los neutrófilos bovinos y los macrófagos alveolares *in vitro*, una comprensión de la importancia de la patobiología global de *Mannheimia haemolytica* en la fiebre de embarque es complicada por la presencia de varios factores de virulencia, incluso la cápsula, los lipopolisacáridos, fimbrias, la enzima sialoglicoproteasa y neuraminidasa (Petras *et al.*, 1995).

Al contrario de la mayoría de las citolisinas de RTX, las leucotoxinas producidas por el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (LtxA) y *Mannheimia haemolytica* (LktA) demuestran los efectos biológicos celulares, tipo específicos y especie específicas. El LtxA de *A. actinomycetemcomitans* que causa caries dentales en los humanos sólo actúa recíprocamente con las células de los linfocitos y los monomielocitos de humanos y algunos primates no humanos y provoca los efectos biológicos (Jeyaseelan *et al.*, 2001).

Basado en la hipótesis del receptor, es lógico predecir que las leucotoxinas RTX se unan a los leucocitos de las especies susceptibles pero no a los leucocitos de las especies no susceptibles. Esta suposición se apoya por la observación que las uniones LKT se limitan a los leucocitos de los bovinos susceptibles pero no a los no susceptibles de los porcinos y los

leucocitos humanos en un ensayo de citometría de flujo para evaluar la unión de LKT (Kenneth *et al.*, 1999).

2.5.1.4. Neuraminidasa

La neuraminidasa se produce por una variedad de bacterias además de *Mannheimia haemolytica*. *Pasteurella multocida* incluye uno de los primeros informes en la producción de neuraminidasa, ésta enzima se liga a la pared celular bacteriana y puede liberarse por extracción con cloruro de sodio (White *et al.*, 1995).

2.5.1.5. Sialidasa

La sialidasa es una enzima que degrada el ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos. Se supone que la sialidasa contribuye a la virulencia de algunos organismos patógenos, sobre todo aquéllos que habitan e invaden las mucosas (Vadillo *et al.*, 2002). Se ha encontrado la producción de sialidasa en aislamientos bacterianos de *Clostridium* y *Vibrio cholerae*. La sialidasa se ha dividido en dos grupos basados en el tamaño. La sialidasa de *Salmonella* y la de *Clostridium perfringens* son de aproximadamente 40 kDa y se consideran miembros de la familia de sialidasas, mientras que la sialidasa de *V. cholerae* es mayor a 80 kDa. Hay ambigüedades en la literatura con respecto al tamaño de la sialidasa de *Pasteurella multocida*. Estos informes hacen pensar en la posibilidad de combinaciones en cuanto a tamaño de la sialidasa en cepas de *Pasteurella multocida* (Mizan *et al.*, 2000).

III. Justificación

El complejo respiratorio bovino es de origen multifactorial, los agentes etiológicos involucrados en las neumonías pueden ser virus, bacterias, micoplasmas, además de haber sinergismos entre virus y bacterias. Estas generalmente son secundarias y producen neumonías y frecuentemente la muerte de los animales.. De los agentes bacterianos involucrados con mas frecuencia se encuentran *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. Las enfermedades respiratorias en bovinos son una importante causa de pérdidas económicas a nivel nacional. En la Comarca Lagunera se han estado realizando estudios de las enfermedades neumónicas en bovinos Holstein que indica la situación de la frecuencia de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*; de acuerdo a estos datos, se consideró importante realizar un estudio microbiológico de muestras obtenidas en rastro, ya que la región representa un centro importante de producción de leche bovina a nivel nacional, y se han demostrado frecuencias de estas bacterias de hasta un 50 % en lesiones neumónicas.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo General:

Determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* de pulmones neumónicos obtenidos de bovinos Holstein, sacrificados en el rastro Municipal de Gómez Palacio, Dgo.

4.2. Objetivos específicos:

4.2.1. Identificar aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y/o *Pasteurella multocida* a partir de pulmones neumónicos obtenidos de bovinos Holstein sacrificados en el rastro Municipal de Gómez Palacio, Dgo.

4.2.2. Determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y/o *Pasteurella multocida* a partir de pulmones neumónicos obtenidos de bovinos Holstein, sacrificados en el rastro Municipal de Gómez Palacio, Dgo.

V. Material y Métodos

El presente estudio fue de tipo descriptivo, prospectivo y transversal. La fase de campo se realizó en el rastro Municipal de Gómez Palacio, Durango. La fase de laboratorio se realizó en la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna y en el Departamento de Fisiopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Palo Alto, Cd. de México. El muestreo se llevó a cabo en forma dirigida obteniendo 68 pares de pulmones con lesiones neumónicas de 550 revisados de bovinos Holstein, tomándose el total de las muestras con lesiones dos días a la semana, durante seis meses (otoño-invierno). Se tomaron muestras de animales que presentaron evidencias patológicas del parénquima pulmonar, las cuales se conservaron frescas y se transportaron con refrigerantes al lugar de trabajo y se procesaron por técnicas microbiológicas.

5.1. Preparación de agar sangre para medio de cultivo

5.1.1. Material

- Matraz con capacidad de 1 litro
- Báscula
- Mecheros
- Autoclave
- Guantes
- Cajas Petri
- Sangre de bovino sano

5.1.2. Procedimiento

1. Para un litro de agar se requirieron 40 g de agar (agar soya tripticasa), se vertió en el matraz y se mezcló homogéneamente; posteriormente se colocó al calor hasta hervir, moviendo constantemente.
2. Se cubrió el matraz y posteriormente se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.
3. Después de esterilizado el agar se procedió a agregarle sangre estéril de bovino (30 ml), mezclando hasta que se integró al agar.
4. Se vertió el agar en cajas de Petri y se dejaron secar al aire en un lugar estéril.
5. Posteriormente se colocaron en la estufa a 39° C para verificar que no estuvieran contaminadas.

5.2. Técnica de siembra en medios de cultivo para la identificación de colonias de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

- 5.2.1. Los medios de cultivo de agar sangre en las cajas de Petri se dividieron en cuadrantes. Se depositó el inóculo en el cuadrante 1 con un asa metálica.
- 5.2.2. Se flameó y enfrió el asa entre cuadrante al realizar extendidos en forma de estrías.
- 5.2.3. Se aseguró que existiera contacto entre las estrías de cada cuadrante (1 con 2, 2 con 3 y 3 con 4).

5.3. Técnica para la realización de frotis de los aislamientos obtenidos

5.3.1. Material

- Laminillas
- Lápiz graso
- Asa microbiológica
- Mechero

5.3.2. Procedimiento

1. Se utilizaron laminillas limpias y marcadas para su identificación, con un lápiz graso se marcó el área donde se colocó la muestra.
2. En la laminilla se colocó una gota de agua destilada, con una asa microbiológica se tomó una pequeña cantidad del cultivo que se mezcló bien.
3. Se extendió la gota sobre la laminilla formando una capa fina, evitando preparar un frotis demasiado grueso.
4. Se dejaron secar las laminillas a temperatura ambiente.
5. Cuando se secó el frotis, se pasó la laminilla 3 veces por la llama del mechero con la capa del frotis hacia arriba, teniendo cuidado de no aplicar calor en forma excesiva ya que estropearía la morfología normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir.

5.4. Procedimiento para la tinción de Gram modificada de Reed

1. Se agregó violeta de genciana por un minuto
2. Se enjuagó con abundante agua
3. Se agregó Lugol por un minuto
4. Se enjuagó con abundante agua
5. Se agregó alcohol acetona durante 15 segundos
6. Se enjuagó con abundante agua
7. Se colocó safranina durante un minuto
8. Se enjuagó con suficiente agua

Los microorganismos que conservaron el color cristal violeta se observaron de color azul o morado (Gram positivos) y los que no lo hicieron mostraron un color rosa o rojo correspondiente a la safranina (Gram negativos).

5.5. Procedimiento para la preparación de las pruebas bioquímicas

5.5.1. Oxidasa (método de Kovacs).

Prueba auxiliar en la identificación de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. En general esta prueba debe realizarse a todas las bacterias Gram negativas. El objetivo de esta prueba fue determinar la producción de la enzima citocromo oxidasa (indofenol oxidasa).

5.5.1.1. Medios y reactivos

Se impregnó un trozo de papel filtro (7 cm de diámetro) con dos a tres gotas de solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil p-fenil-diamina. No se dejó que el papel se secase completamente.

5.5.1.2. Mecanismo

Las bacterias que no producen oxidasa son capaces de oxidar el reactivo, con la consecuente aparición de color.

5.5.1.3. Interpretación de resultados

Utilizando un asa de platino se tomaron colonias del microorganismo a probar. Se frotaron las colonias sobre las superficies de papel filtro.

- La aparición de un color púrpura intenso indicó una prueba positiva. Reacciones tardías fueron ignoradas, una prueba negativa estuvo indicada por cualquier otro color o ausencia del color.

5.5.2. Citrato de Simons

5.5.2.1. Objetivo

Determinar la capacidad bacteriana para utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono.

5.5.2.2. Medios y reactivos

Se utilizó un agar que contenía 0.2% de citrato de sodio, al cual se le adicionó un indicador de pH (azul de bromotimol).

5.5.2.3. Mecanismo

La bacteria al utilizar el citrato, libera residuos de sodio que al unirse con radicales OH alcaliniza el medio. Bajo estas condiciones el indicador de pH cambia de color verde a azul.

El método de siembra fue por estría, incubándose a 37° C durante 24 a 48 horas, en ocasiones fue necesario prolongar este periodo hasta 7 días antes de considerar una reacción negativa.

5.5.2.4. Interpretación de resultados

- Prueba positiva: cambió del medio a color azul
- Prueba negativa: el medio permaneció verde.

5.5.3. Producción de indol

5.5.3.1. Aplicación

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

5.5.3.2. Medios y reactivos

Se utilizó el medio de SIM (Sulfhídrico, Indol, Motilidad) al cual después del desarrollo bacteriano, se le agregó el reactivo de Kovac's (150 ml de alcohol isomílico, con 10 g de p-dimetil amino benzaldehído, a los que se adicionaron 50 ml de ácido clorhídrico concentrado).

5.5.3.3. Mecanismo

La triptofanasa hidroliza el triptofano con la liberación de anillos indólicos. La adición del reactivo de Kovac's detecta estos anillos indólicos

libres y por lo tanto, indirectamente la producción de la enzima triptofanasa por parte de la bacteria.

5.5.3.4. Método de siembra e incubación

1.- Se inoculó el medio de SIM por picadura con un asa recta (2/3 partes del tubo) y se incubó de 24 a 48 horas a 37° C.

2.- Se agregaron al tubo de SIM unas gotas del reactivo.

- Prueba positiva: anillo rojo en la superficie.
- Prueba negativa: presencia o no de anillo de cualquier color en la superficie.

5.5.4. Triple azúcar hierro (TSI)

Prueba para diferenciar entre géneros de bacilos Gram-negativos.

5.5.4.1. Objetivo

Es para determinar la capacidad para utilizar azúcares, producción de ácidos sulfhídricos y producción de gas por fermentación.

5.5.4.2. Medios y reactivos.

El medio de TSI contiene agar, peptona y sales minerales; tres azúcares (glucosa, lactosa y sucrosa), tiosulfato de sodio, sulfato ferroso y rojo de fenol como indicador de pH.

5.5.4.3. 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 la oxidación con la producción de ácido. Los cambios de pH son detectados por 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 de 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 dan lugar a lecturas posibles.

5.5.4.4. Método de siembra

Se realizó por picadura en el fondo del tubo y estría continua en la superficie, procurando inocular abundante material de la colonia bacteriana. El tapón del tubo se dejó ligeramente flojo para facilitar la eliminación del gas producido. El periodo de incubación fue de 18 a 24 horas como máximo. El prolongar la incubación da lugar a lectura falsa, ya que algunas reacciones pueden revertirse.

5.5.5. Urea

5.5.5.1. Aplicación

Se utiliza para diferenciar entre especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Para diferenciar *Proteus* de otros géneros. Útil para la diferenciación rápida de *Pasteurella ureae* y *Brucella spp.*

5.5.5.2. Objetivo

Determina la habilidad de las bacterias de producir enzimas ureasa que desdobla la urea en amoniacó.

5.5.5.3. Medios y reactivos

El método que se utilizó fue en medio de agar sólido con base peptonada, glucosa y minerales, conteniendo 2 % de urea y el mismo indicador de pH.

5.5.5.4. Mecanismo

Algunas bacterias poseen la capacidad de reducir la urea hasta amoniacó gracias a la enzima ureasa. El amoniacó a su vez se combina con el agua y forma hidróxido de amoniacó (alcalino). La presencia de hidróxido de amonio se detectó mediante un cambio de color por el pH.

El periodo de incubación durante 1 a 7 días a 37° C, obteniendo como resultados lo siguiente

- Prueba positiva: se tiñe de color rojo.
- Prueba negativa: sin cambio en el medio.

VI. Resultados

6.1. Evidencias patológicas observadas

De los 550 pares de pulmones revisados de bovinos sacrificados en el rastro de Gómez Palacio, Durango, durante 6 meses en la temporada otoño invierno, 68 (12.36 %), presentaron lesiones neumónicas caracterizadas por áreas rojas o grises con consolidación anteroventral y con fibrina, características de las bronconeumonías exudativas y fibrinosas, o mixtas, fibrinopurulentas. Las 68 muestras que presentaron lesiones fueron cultivadas en Agar Sangre con una base de Agar Soya Trypticasa.

6.2. Identificación de las bacterias

Las colonias de *Pasteurella multocida* se hicieron visibles después de 24 horas a 37° C, postcultivo usualmente midieron de 2 a 3 mm de diámetro, fueron circulares, grisáceas, y sin hemólisis, algunas cepas se apreciaron con aspecto de colonias mucoides. En el caso de *Mannheimia haemolytica* las colonias también se hicieron visibles después de 24 horas a 37° C, fueron circulares, grisáceas, mas pequeñas que *Pasteurella multocida* y con la capacidad de producir hemólisis parcial o completa que en ocasiones no fue mas grande que la colonia y por lo tanto no fue aparente a menos que se quitara la colonia.

Los microorganismos teñidos que conservaron el color rosa o rojo correspondiente a la safranina, fueron clasificados como Gram negativos y se procedió a realizar las pruebas bioquímicas. De los 68 cultivos se obtuvieron 20 (29.41 %) aislamientos Gram negativos.

6.3. Resultados de las pruebas bioquímicas

De acuerdo a las características de las colonias y a la tinción de Gram (negativo), se procedió a realizar las pruebas bioquímicas, para diferenciar entre *M. haemolytica* y *P. multocida*, como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación entre los géneros *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

Pruebas	Positivas	Negativas
Oxidasa	20	0
TSI	20*	0
Motilidad	0	20
Glucosa	20	0
Hemólisis	10	10
Reducción de Nitratos	20	0
Indol	10	10
Urea	0	20

* Reacción de acidez

Tanto *Mannheimia haemolytica* como *Pasteurella multocida* son oxidasa positivas, tienen reacción de acidez, fermentan la glucosa y presentan reducción de nitratos. Son negativas a motilidad y a urea. Se diferencian entre sí porque *M. haemolytica* produce hemólisis del medio de cultivo en Agar Sangre y es Indol negativa, por lo tanto *P. multocida* no produce hemólisis del medio y es Indol positiva.

De las 20 muestras Gram negativas, y de acuerdo a las características bioquímicas, 9 (45 %) fueron *Mannheimia haemolytica*, 9 (45 %) *Pasteurella multocida*, mientras que en solo 2 casos (10 %) se logró el aislamiento de una asociación de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* de muestras de pulmones neumónicos del rastro de Gómez Palacio, Dgo.

AISLAMIENTOS			
<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>	<i>Mh + Pm</i>	TOTAL
n (%)	n (%)	n (%)	
9	9	2	20
(45%)	(45%)	(10)	(100%)

VII. Discusión

En los resultados del presente estudio se observa que la frecuencia de infecciones bacterianas de las vías respiratorias en bovinos Holstein adultos sacrificados en el rastro Municipal de Gómez Palacio, Durango, fue de 12.36 % ya que solo 68 de 550 presentaron lesiones neumónicas y en 20 (29.4 %) casos se aislaron *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. En un estudio previo en el mismo rastro, se observaron 4.34 % pulmones con lesiones de neumonía, y se encontro un 17.85 % de aislamientos (Urquiza, 2006). Las diferencias entre ambos estudios fueron debido a que en el estudio de Urquiza las muestras fueron obtenidas durante la primavera y en el presente estudio fueron durante el otoño e invierno, periodo en el cual las temperaturas bajas permitieron el desarrollo de las infecciones neumónicas.

En México existe escasa información sobre aislamientos de *Pasteurellas* de pulmones neumónicos en becerros, y los que hay datan de hace 7 años o más (Jaramillo, *et al.*, 1987; Pijoan *et al.*, 1999). Por otra parte, la mayoría de estos reportes se han descrito en ovinos y no reflejan la problemática nacional de la pasterelosis neumónica en bovinos (Argueta, *et al.*, 1988; Morales *et al.*, 1993).

Los aislamientos de *Mannheimia haemolytica* en becerros, se han reportados con porcentajes mas altos que *Pasteurella multocida*, de acuerdo a lo descrito por Jaramillo y col. (1987), en un estudio realizado en rastros del Estado de México, en becerros Holstein de 1 a 4 semanas de edad, donde encontraron 22 % de *Mannheimia haemolytica* y 11 % de *Pasteurella multocida* (Jaramillo, *et al.*, 1987).

No obstante, otro reporte difiere con lo reportado por Blanco-Viera y col., (1995), en el rastro de Ferrería en la ciudad de México, donde encontraron en 13,000 pares de pulmones, 8,000 de ovinos y 5000 de

bovinos, donde un 1.7 % (224) con lesiones neumónicas, de estas, 112 (50%) presentaron aislamientos de cepas de pasteurellas, de éstas, *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* representó el 35.7 % y *Pasteurella multocida* el 64.3 %. A pesar de estos resultados, la frecuencia de neumonías reportada es muy baja comparada con el presente estudio en la Comarca Lagunera.

Sin embargo, otro estudio realizado en Tijuana, Baja California, revela hallazgos muy similares a los reportados en ésta investigación, con respecto al porcentaje similar entre ambas bacterias, con un 34.0 % de aislamientos de *P. multocida* y 31 % de *M. haemolytica* (Pijoan, *et al.*, 1999).

En la Comarca Lagunera, recientemente realizó un estudio microbiológico para identificar estas bacterias en 56 (4.34 %) muestras de pulmones neumónicos tomadas de rastro, de las cuales se obtuvo 10 (17.85 %) aislamientos, 6 (10.71 %) de *Pasteurella multocida* y 4 (7.14 %) de *Mannheimia haemolytica*, no hubo diferencia estadística significativa entre los aislamientos (Urquiza, 2006).

También se llevaron a cabo dos estudios microbiológicos con hisopos nasales de bovinos Holstein clínicamente sanos, en la región lagunera. El primero por Flores (2005), de 1165 muestras obtuvo 72 (6.18 %) aislamientos, 39 (45.8 %) de *Mannheimia haemolytica* y 33 (54.2 %) de *Pasteurella multocida*. En el segundo, González, (2005), a partir de 737 muestras de hisopos nasales, recuperó un total de 137 (18.6%) aislamientos, 46 (33.6 %) fueron de *Mannheimia haemolytica*, 65 (47.4 %) de *Pasteurella multocida* y 26 (19 %) aislamientos de ambas bacterias. Estos resultados, aunque fueron de animales sanos, son similares a los encontrados en esta investigación, ya que en ambos casos, no hubo diferencia significativa en la presencia de una u otra bacteria.

En la Comarca Lagunera, Cruz (2005) trabajó 111 hisopos nasales de bovinos clínicamente enfermos de neumonía e informó que de 44 (39.6%) muestras positivas, 26 (59 %) fueron de *Pasteurella multocida*, 11 (25 %) de *Mannheimia haemolytica* y 7 (16 %) de ambas bacterias.

Estos estudios de pasteurelisis pulmonar de animales sanos, enfermos y de muestras de rastro evidencian una marcada diferencia entre el aislamiento de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, ya que en animales sanos y muestras de rastro no hay diferencia en el aislamiento de una u otra bacteria, mientras que en animales enfermos es mayor la cantidad de aislamientos de *Pasteurella multocida* que de *Mannheimia haemolytica*. Habrá que plantear nuevas investigaciones para identificar estos sucesos observados en la Comarca Lagunera.

Otra característica de esta investigación es que los resultados surgen a partir de animales sacrificados en rastro, de animales mayores de 1 año de edad, donde no fueron numerosas las lesiones neumónicas encontradas; estos tipos de estudios no son comunes y no hay reportes recientes ya que en la literatura nacional se encontró un estudio de 1987 por Jaramillo y col. en becerros de 1 a 4 semanas de edad. Además, la causa del sacrificio de los bovinos Holstein que llegan al rastro no está bien establecida, probablemente es debido a una baja producción de leche, aunado a infertilidad. Los animales que presentan signología o mueren por problemas de neumonía no llegan al rastro ya que con frecuencia son tratados con una gran cantidad de antibióticos y no son aptos para el consumo humano.

Las lesiones neumónicas encontradas, caracterizadas por bronconeumonías exudativas y fibrinosas, con áreas rojas o grises de consolidación y atelectasia anteroventral y lesiones crónicas con fibrosis, son similares a las descritas por otros investigadores como Trigo y col. 1982; Kiorpes, y col. 1988; Virtala y col. 1996; Pijoan y col. 1999.

VIII. Conclusión y recomendaciones

M. haemolytica y *P. multocida* son las principales bacterias encontradas que interactúan en infecciones pulmonares de bovinos Holstein adultos en la Comarca Lagunera; sería recomendable realizar estudios complementarios que refieran la concordancia del diagnóstico con la inspección postmortem, la histopatología y estudios microbiológicos, para caracterizar el grado de severidad con las bacterias relacionadas.

Otra aspecto relevante es que tanto *M. haemolytica* como *P. multocida* fueron aisladas en porcentajes similares, sin embargo, existen otros patógenos como *Mycoplasma spp* y *Hematophilus somni* que no fueron incluidos en el trabajo y se sugiere que en estudios posteriores se analicen.

Se considera que el número de muestras fue el adecuado ya que el muestreo se llevó a cabo en una época del año (otoño–invierno) y fueron tomadas en forma dirigida. Al mismo tiempo la toma de muestras, así como el procedimiento de laboratorio son los recomendados por otros investigadores.

Futuras investigaciones al respecto son esenciales para darle continuidad al estudio y medir tasas de prevalencia e incidencia y reportar en la región los hallazgos para tener al tanto de los avances a los Médicos Veterinarios clínicos de campo y productores, de los acontecimientos sobre estas dos importantes bacterias en la Comarca Lagunera.

IX. Literatura citada

- Angen, Ø., Mutters, R., Caugant, D.A., Olsen J.E and 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 (1): 67-86.
- Argueta, J. (1988).** Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. *Rev. Vet. Mex.* 19: 93-97.
- Blackall, PJ, Angen Ø., Fegan N, Blackall LL., Mutters R. and Bisgaard M. (2001).** Characterization of a novel *Mannheimia* sp from Australian feedlot cattle. *Aust. Vet. J.* 79 (9): 634-639.
- Blackall, P.J., Bisgaard M and Stephens CP. (2002).** Phenotypic characterization of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aust. Vet. J.* 80: 1-2
- Brogden, K.A., Ackermann, M.R., and Debey, B.M. (1995).** *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-associated protein induces pulmonary inflammation after bronchoscopic deposition in calves and sheep. *Infect. Immun.* 63 (9): 3595-9.
- Callan, R. (2002).** Biosecurity and bovine respiratory disease. *Vet. Clin. Food. Anim. Practice.* 18: 57-77.
- Chen, H.I., Hulten, K., and Clarridge, J.E. (2002).** Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. *J. Clin. Microbiol.* 40 (9): 3438-3441.
- Chidambaram, M., Sharma, B., Petras, S.F., Reese, C.P., Froshauer, S. and Weinstock, G.M. (1995).** Isolation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infect. Immun.* 63 (3): 1027-1032.
- Cruz, M.Y. (2005).** Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella haemolytica* en bovinos Holstein clínicamente enfermos de neumonía en la Comarca Lagunera, durante la temporada Otoño – Invierno. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Torreón, Coah.

- Davies, R. L. (2004).** Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology*. 150 (12): 4199-4210.
- Davies, R.L., Campbell, S. and Whittam, T.S. (2002).** Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (lktCABD) in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J. Bacteriol.* 184 (1): 266-277.
- Davies R.L., Paster B.J. and Dewhirst F.E. (1996).** Phylogenetic Relationships and Diversity within the *Pasteurella haemolytica* Complex Based on 16S rRNA Sequence Comparison and Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide Analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46 (3): 736-744
- Davies, R.L., Whittam, T. and Selander, R. (2001).** Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lktA) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *J. Bacteriol.* 183 (4): 1394-1404.
- Fales-Williams, A., Brogden, K., Huffman, E., Gallup, J. and Ackermann, M. (2002).** Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation. *Vet. Pathol.* 39 (6): 706-711.
- Fedorova, N. D., and Highlander, S.K. (1997).** Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect. Immun.* 65 (7): 2593-2598.
- Flores, G.D. (2005).** Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella haemolytica* en bovinos Holstein clínicamente sanos en la Comarca Lagunera. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Torreón, Coah.
- Fodor, L., Pénczes, Z. and Varga, J. (1996).** Coagglutination test for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 34 (2): 393-397.
- González, F.L. (2005).** Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella haemolytica* en bovinos Holstein clínicamente sanos de neumonía en la Comarca Lagunera, durante la temporada Otoño – Invierno. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Torreón, Coah.

- 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 Micología Veterinarias. UNAM pp
- Harper, M., Cox, A.D., Michael, F.S., Wilkie, I.W., Boyce, J.D. and Adler, B. (2004). A Heptosyltransferase Mutant of *Pasteurella multocida* Produces a Truncated Lipopolysaccharide Structure and Is Attenuated in Virulence. *Infection and Immunity*. 72 (6) 3436–3443.
- Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., 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. *Rev. Vet. Mex.* 18: 185 – 187.
- Jeyaseelan, S. M. S., Kannan, M. S. Briggs, R. E. ThumbikaT, P. and Maheswaran S. K. (2001). *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin Activates a Nonreceptor Tyrosine Kinase Signaling Cascade in Bovine Leukocytes, Which Induces Biological Effects. *Infection and Immunity*. 69 (10) 6131–6139.
- Juárez, F. (2001). Estudio patológico, microbiológico y epidemiológico de enfermedades respiratorias en bovinos de engorda en Sinaloa, México. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp
- Kenneth, Y.S., Clinkenbeard D., Cudd, L.A., Clarke, C.R. and Clinkenbeard, P.A. (1999). Correlation of *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin Binding with Susceptibility to Intoxication of Lymphoid Cells from Various Species. *Infection and Immunity*. 67 (12) 6264–6269.
- Kiorpes, A.L., Butler, D.G., Dubielzig, R.R., and Beck, K.A. (1988). Enzootic pneumonia in calves: clinical and morphological features. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.* 10: 248 – 260.
- Kodjo, A., Villard, L., Bizet, Ch. and Martel, J. (1999). Pulsed-field gel electrophoresis is more efficient than ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. *J Clin Microbiol.* 37(2): 380-385.
- Kuhnert, P., Korczak, B., Falsen, E., Straub, R., Hoops, A., Boerlin, P., Frey J. and Mutters, R. (2004). *Nicoletella semolina* gen. nov., sp. nov., a New Member of Pasteurellaceae Isolated from Horses with Airway Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 12: 5542–5548
- Li J. and Clinkenbeard K.D. (1999). Lipopolysaccharide Complexes with *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Infection and Immunity*. 67 (6) 2920–2927.

- Lo, R. Y., L. J. McKerral, Hills T. L. and Kostrzynska, M. (2001). Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infection and Immunity*. 69 (7): 4458-4464.
- Malazdrewich C., Ames T., Abrahamsen M. and Maheswaran S. (2001). Pulmonary expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 in the acute phase of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Pathol.* 38 (3):297-310.
- Marciel, A.M. and Highlander, S.K. (2001). Use of Operon Fusions in *Mannheimia haemolytica* To Identify Environmental and cis-Acting Regulators of Leukotoxin Transcription. *Infection and Immunity*. 69 (10) 6231-6239.
- Mizan, S., Henk, A., Stallings, A., Maier, M, and Lee, M.D. (2000). Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.* 182 (24): 6874-6883.
- Morales, J., Jaramillo, M.L., Oropeza, V.Z., Tórtora, P.J., Trigo, T.F. y Espino, R. G. (1993). Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Rev. Vet. Mex.* 24 (2): 97-105.
- Murphy, G.L., Whitworth L.C., Clinkenbeard, K.D. and Clinkenbeard, P.A. (1995). Hemolytic Activity of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Infection and Immunity*. 63 (8) 3209-3212.
- Pachificus, A. M. (2000). Prevalence, epidemiology, and virulence of *Pasteurella multocida* and related organisms obtained from poultry and their animal contacts. PhD Thesis. Department of Veterinary Microbiology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Petras, S.F., Chidambaram, M., Illyes, E.F., Froshauer, S., Weinstock, G.M. and Reese, C.P. (1995). Antigenic and virulence properties of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infection and Immunity*. 63 (3): 1033-1039.
- Pijoan, A.P. (1997). Factores de manejo asociados con la mortalidad de becerras en establos de Tijuana, Baja California, México. *Vet. Mex.* 28 (3): 269-275.
- Pijoan, A.P. (1999). Caracterización de los procesos neumónicos en becerros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Rev. Vet. Mex.* 30 (2): 149-155.

- Pijoan, A.P. y Aguilar, R.F. (2000). Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana. *Vet. Mex.* 31 (2): 153-156.
- Radi, Z., Register K., Lee, K., Kehri, M., Brogden, K., Gallup, J. and Ackermann, M. (1999). In situ expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA in calves with acute *Pasteurella haemolytica* pneumonia. *Vet. Pathol.* 36 (5): 437-444.
- Storz, J., Lin, X., Purdy, C.W., Chouljenko, V.N., Kousoulas, K.G., Enright, F. M., Gilmore, W.C., Briggs, R.E., and Loan, R.M. (2000). Coronavirus and *Pasteurella* infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *J. Clin. Microbiol.* 38 (9): 3291-3298.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., and Dawkins, H. J. (1998). Development of PCR assays for species-and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36 (4): 1096-1100.
- Trigo, T.F. (1991). Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Rev. Vet. Mex.* 22 (2): 31-134.
- Trigo, T.F. (1987). El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cien Vet.* 4: 1-36.
- Trigo, T.E., Trigo, T.F., Hernández, L.G., Ramírez, C.C., y Berruecos, V.M. (1982). Patología y bacteriología de los pulmones neumónicos de becerros. *Vet. Mex.* 13: 131-140.
- Urquiza S.E. (2006). Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* de pulmones neumónicos de bovinos Holstein Sacrificados en el rastro municipal de Gómez Palacio, Durango. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Torreón, Coahuila, México.
- Vadillo, S., Jiménez, R., Piriz, S. (2002). Estructura y función de la célula bacteriana. Manual de Bacteriología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. Primera Edición.
- Virtala, A.M.K., Mechor, G.D., Grohn, Y.T., Erb, H.N. and Dubovi, E.J. (1996). Epidemiologic and pathologic Characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208: 2035-2042.

- Wang, Z., Clarke, C., and Clinkenbeard, K. (1998).** *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. *Infection and Immunity*. 66 (5): 1885-1890.
- White, D., Jolley W., Pudy, C. and Straus, D. (1995).** Extracellular Neuraminidase Production by a *Pasteurella multocida* A3 Strain Associated with Bovine Pneumonia. *Infection and Immunity*. 63 (5): 1703-1709.
- Yoo, H.S, Maheswaran, S.K., Lin, G., Townsend, E.L., and Ames, T.R. (1995).** Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide. *Infection and immunity*. 63 (2): 381-388.