

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia haemolytica*  
Y *Pasteurella multocida* DE PULMONES NEUMÓNICOS DE  
BOVINOS HOLSTEIN SACRIFICADOS EN EL RASTRO  
MUNICIPAL DE GÓMEZ PALACIO, DURANGO.**

**POR:**

**ELSA URQUIZA SANTILLÁN**

**TESIS**

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

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**ASESOR**

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

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**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**

**APROBADA POR LOS ASESORES**

**PRESIDENTE DEL JURADO**

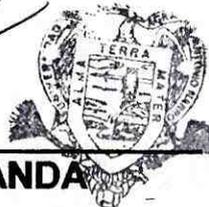
*Ramón A. Delgado G.*

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

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

*Ernesto Martínez Aranda*

**M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA**



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia haemolytica*  
Y *Pasteurella multocida* DE PULMONES NEUMÓNICOS DE  
BOVINOS HOLSTEIN SACRIFICADOS EN EL RASTRO  
MUNICIPAL DE GÓMEZ PALACIO, DURANGO.**

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ.**  
**PRESIDENTE**

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

  
\_\_\_\_\_  
**M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO**  
**VOCAL**

  
\_\_\_\_\_  
**M.V.Z. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS**  
**VOCAL SUPLENTE**

## **Agradecimientos**

**Wuw! después de dos años haciendo mi tesis me doy cuenta que he llegado a la parte más difícil, expresar con palabras todo lo que siento por las personas que me han ayudado durante este proceso, además que sin duda esta será la página mas leída después de la portada.**

**Así que, Gracias....**

**Dios, por levantarme siempre.**

**Mamá porque sabes que sin ti no hubiera llegado hasta aquí.**

**Hermanos que aunque lejos siempre están conmigo.**

**Guadalupe Machado por ser mi me mejor amiga y la más latosa!**

**A mi Alma Mater, por formarme como profesional.**

**A todos mis amigos que de alguna forma tuvieron que ver con esta tesis incluso quitándome el tiempo, Lucio González, Leodan García, Isidoro Medina, Ruth Dardon, Eva Astorga, Alma, Dinora Flores.**

**A la Dra. Alicia Servín por su gran ayuda.**

**Por supuesto a Ramón Delgado que más que mi asesor ha sido mi amigo.**

**Al Dr. Francisco Trigo Tavera.**

**Al M.C. Carlos J. Jaramillo Arango.**

**Al Dr. Francisco Aguilar Romero.**

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

**Francisco Trigo Tavera.**

## **DEDICATORIAS**

**A mi mamá:**

**Ana María Santillán Flores.**

**A mis hermanos:**

**Patricia Urquiza.**

**Daniel Urquiza.**

**Ana Luisa Flores.**

**Rosario Flores.**

**A mis sobrinos:**

**Emilia, Fer, Isaid, Diego, Val, Tanya, André.**

**A Guadalupe Machado.**

**Y finalmente a mi.**

## INDICE

	Página
Agradecimientos.	i
Dedicatorias.	ii
Resumen.	iii
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	2
2.1. Taxonomía y morfología.	2
2.2. Enfermedades producidas por <i>P. multocida</i> y <i>M. haemolytica</i>	4
2.3. Signos	6
2.3.1. Lesiones	7
2.4. Patogenia.	9
2.5. Diagnóstico.	11
2.5.1. Pruebas serológicas de identificación	12
2.6. Epizootiología.	13
2.6.1. Hospederos.	14
2.6.2. Transmisión.	15
2.6.3. Mortalidad y morbilidad.	15
2.7. Zoonosis.	15
2.8. Control y tratamiento.	16
2.8.1. Resistencia.	17
2.8.2. Profilaxis.	18
3. Justificación.	18
4. Objetivos.	19
5. Material y Métodos.	19
5.1. Toma de muestras.	19
5.2. Estudio bacteriológico.	19
5.3. Pruebas bioquímicas de identificación.	20

<b>6. Resultados y discusión.</b>	<b>24</b>
<b>7. Conclusión.</b>	<b>26</b>
<b>8. Literatura citada.</b>	<b>27</b>

## Resumen.

Se revisaron 1288 muestras de bovinos recién sacrificados y se tomaron muestras de pulmones con lesiones macroscópicas sugestivas de procesos neumónicos que se utilizaron para realizar cultivos bacteriológicos. Las pruebas bioquímicas que se utilizaron para la identificación fueron la prueba de oxidasa (Método de Kovacs), Citrato de Simons, Indol, Triple Azúcar Hierro, y Urea. Se encontraron 56 (4.34 %) muestras con lesiones pulmonares, de los cuales hubo 10 (17.85 %) aislamientos, 6 (10.71 %), de *Pasteurella multocida* y 4 (7.14 %) de *Mannheimia haemolytica*, demostrándose que la frecuencia de aislamientos de *P. multocida* y *M. haemolytica* fue baja en muestras de pulmón tomadas en el rastro. Son escasas las investigaciones similares a la presente, por lo cual es un antecedente para futuros trabajos. En México no hay estudios que estimen el costo de la enfermedad, además son pocos las investigaciones que nos indiquen la presencia de las pasterelas en el país y no hay informes en la Comarca Lagunera, por tal motivo la finalidad del presente trabajo fue identificar aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* en lesiones pulmonares obtenidas en rastro y reportar la frecuencia de las mismas.

## 1. Introducción.

Las neumonías son consideradas como los padecimientos de mayor importancia en los animales domésticos (Jaramillo *et al.*, 1997). Muchas investigaciones han demostrado que las enfermedades del aparato respiratorio son causadas por la interacción de factores ambientales, entre ellos: bajas temperaturas, contaminantes atmosféricos, estrés, agentes virales y bacterianos. La neumonía y la muerte asociada con enfermedades respiratorias están relacionadas principalmente con *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* (Jaramillo *et al.*, 1987). Las especies de *Pasteurella* son comensales comunes del tracto superior respiratorio de los rumiantes (Jaworski *et al.*, 1998), donde pueden permanecer sin causar daño. Esta colonización inofensiva resulta de un equilibrio entre el crecimiento bacteriano y la respuesta del hospedero que evita una colonización profunda por mecanismos inmunes a nivel local (Jaramillo *et al.*, 1999). *Mannheimia haemolytica* es el principal microorganismo de las pasteurelosis neumónicas bovinas y de la fiebre de embarque o fiebre de corral (Reggie 2001). También se puede aislar, aunque con menor frecuencia *Pasteurella multocida* (Trigo, 1991). Esta enfermedad respiratoria es económicamente significativa en el ganado contabilizando aproximadamente el 30 % del total de las muertes y está asociada con una pérdida anual de un billón de dólares sólo en Norteamérica (Reggie, 2001). En México no hay estudios que estimen el costo de la enfermedad, además son pocos las investigaciones que nos indiquen la presencia de las pasterelas en el país y no hay informes en la Comarca Lagunera, por tal motivo la finalidad del presente trabajo es identificar aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* en lesiones pulmonares obtenidas en rastro.

## 2. Antecedentes.

### 2.1. Taxonomía y morfología.

Para clasificar a la familia Pasteurellaceae, se han incluido nueve diferentes géneros, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Lonepinella*, *Phocoenobacter*, *Histophilus*, *Gallibacterium*, y *Volucribacter* (Kuhnert et al., 2004).

El género *Pasteurella*, son organismos pleomórficos cocobacilos o bacilos de diversos tamaños usualmente de 0.2 a 0.3 por 0.3 a 0.2 micrómetros, se agrupan en cadenas cortas. Presentan una tendencia a mostrar coloración bipolar, la cual es más manifiesta con las tinciones de Leishman y Wright. Son aerobios o anaerobios facultativos, Gram negativos, son inmóviles, no forman esporas poseen cápsula. La mayoría fermentan los carbohidratos pero producen una pequeña cantidad de ácido, no fermentan la lactosa o lo hacen débilmente, no producen gas y no coagulan la leche (Blanco, 1990). Todas las especies son positivas a la oxidasa pero divergen entre sí en otras reacciones bioquímicas (Hernández et al., 2003).

En agar sangre, el crecimiento es de 24 a las 28 horas de incubación, las colonias son de tamaño variable dependiendo de la especie, en general miden de 2 a 3 mm de diámetro, son circulares, grisáceas, no hemolíticas (excepto *Mannheimia haemolytica*) y algunas cepas producen colonias mucoides (Blanco, 1990).

*Pasteurella multocida* produce Indol, mientras que *Mannheimia haemolytica* no produce Indol (Blanco, 1990).

*Pasteurella haemolytica* es una bacteria corta, pleomórfica con hemólisis positiva (en ocasiones poco aparente) (Argueta et al., 1988).

***Pasteurella multocida***. El género *Pasteurella* pertenece a la familia de las *Pasteurellaceae* (Blanco et al., 1990).

*P. multocida* esta clasificada dentro de las tres subespecies, *P. multocida* subespecie *gallicida*, *P. multocida* subespecie *multocida* y *P. multocida* subespecie *séptica* (Davies, 2004).

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

Las infecciones de *P. multocida* serogrupo A son las responsables de una severa bronconeumonía en vaquillas lecheras y aproximadamente el 25 % de las neumonías en ganado de carne (Dabo *et al.*, 1997).

***Mannheimia haemolytica*.** La bacteria *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* es un nuevo miembro de la familia *Pasteurellaceae* que inicialmente incluía al género *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella* (Reggie, 2001).

El agente causal de la fiebre de embarque fue inicialmente llamado *Bacterium bipolar multocidom* por Theodore Kitt en 1885. En 1896, Flugge le renombró como *Bacillus boviséptica*, la cual se subdividía en distintos grupos que causaban la neumonía fibrinosa bovina (*Pasteurella boviséptica*) y septicemia hemorrágica (conocida como *Pasteurella multocida*) (Highlander *et al.*, 2001).

En 1932 Newson y Cross propusieron el nombre de *Pasteurella haemolytica* porque la bacteria causaba neumonía en becerros, dos biotipos de *P. haemolytica* fueron descritos por Smith (1959, 1961), los biotipos fueron designados A y T basándose en la habilidad para fermentar arabinosa o trealosa respectivamente (Blackall *et al.*, 2001). Se identificaron 12 serotipos A y 4 serotipos T. y un serotipo adicional de *P. haemolytica* (A17) (Reggie, 2001).

Cada aislamiento de *P. haemolytica* se designaba por una combinación de su

biotipo y su serotipo (Kodjo *et al.*, 1999; Angen *et al.*, 1999).

Los serotipos 3, 4, 10 y 15 eran asociados con el biotipo T y los serotipos restantes con el biotipo A (Angen *et al.*, 1999).

*Pasteurella haemolytica* se excluyó del género *Pasteurella* en 1985 (Blackall *et al.*, 2001). En 1990 el biotipo T (serotipos T3, T4, T10, y T15) son reclasificados, separados y nombrados *Pasteurella trehalosi* (Blackall *et al.*, 2002).

Recientemente, en 1999, *Pasteurella haemolytica* biotipo A fue reclasificada dentro de un nuevo género llamado *Mannheimia*. El rango de lo que se consideró una vez como el biotipo A de *P. haemolytica*, específicamente *P. haemolytica* serovariedad (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) se reconocen ahora como *M. haemolytica*. (Reggie, 2001; 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* (Angen *et al.*, 2002).

Actualmente las cepas no fermentadoras de trehalosa forman el género *Mannheimia* y las fermentadoras de trehalosa se conocen como *P. trehalosi* (Gutiérrez *et al.*, 2003). La nueva designación de *Mannheimia haemolytica* será usada hasta adoptar el cambio (Reggie, 2001).

## **2.2. Enfermedades producidas por *P. multocida* y *M. haemolytica***

Las principales especies de *Pasteurellas* involucradas en neumonías de rumiantes son normalmente consideradas *P. multocida* y *M. haemolytica* (Bisgaard *et al.*, 1991).

Infecciones causadas por *P. multocida* incluyen el cólera aviar, rinitis atrófica progresiva en cerdos, neumonía en bovinos, ovejas y cerdos (Davies, 2004), mastitis, abortos e infecciones localizadas en el ganado (Miranda *et al.*, 2004;

Davies *et al.*, 2004) septicemia en ovejas, y septicemia de los conejos (Dabo *et al.*, 1997). Además, *P. multocida* es responsable de infecciones en venados, causa enfermedad en el tracto respiratorio en conejos y esta asociada con infecciones en humanos resultando por mordedura de perros y gatos (Davies, 2004).

En el ganado *Pasteurella multocida* serogrupos E y B son los patógenos bacterianos de la septicemia hemorrágica (Hunt *et al.*, 2000). El tipo D se aísla principalmente de cerdos causando rinitis atrófica (Ruffolo *et al.*, 1997) y en ocasiones de bovinos con problemas neumónicos; no se ha delimitado su región geográfica y no tiene relación con la septicemia hemorrágica (García *et al.*, 1988).

*Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotipo A1 es el principal agente patógeno bacteriano involucrado en la pasteurellosis neumónica bovina, normalmente llamada fiebre de embarque (Marciel y Highlander, 2001; Bosch *et al.*, 2004; Fedorova *et al.*, 2000).

La pasteurellosis neumónica es una enfermedad común de las ovejas y cabras alrededor de todo el mundo, es causada por *Mannheimia haemolytica* (Zamri-Saad y Mera, 2001; Davies *et al.*, 1997; Bisgaard *et al.*, 1991), patógeno muy conocido mundialmente de los rumiantes causa neumonía en el ganado y ovejas, mastitis y de vez en cuando artritis y meningitis en la oveja (Fodor *et al.*, 1996). También puede ser encontrada en mastitis de ganado de leche (Blackall *et al.*, 2002). *M. haemolytica* A2 es responsable de las pasteurellosis encontradas en rumiantes salvajes (Kodjo *et al.*, 1999).

*M. granulomatis* se ha aislado de casos de paniculitis y bronconeumonía en bovinos; también se ha encontrado en casos de conjuntivitis y bronconeumonía de venados (Gutiérrez *et al.*, 2003). Esta asociada con neumonías y conjuntivitis purulenta en especies leporidas y con granulomas de la piel y otras enfermedades en el ganado (Angen *et al.*, 2002).

*M. glucosida* normalmente no está asociada a enfermedades y probablemente

representa parte de la microflora residente de tracto respiratorio alto.

*M. ruminalis*, bacteria no hemolítica que ha sido aislada del rumen de bovinos y ovinos y no está asociada a la presencia de enfermedad.

*M. varigena* ha sido aislada de neumonía, mastitis y septicemia tanto en bovinos y cerdos (Gutiérrez et al., 2003).

### 2.3. Signos

La expectativa de los signos clínicos van correlacionados con las causas patológicas. Por esta razón frecuentemente se utilizan en pacientes humanos para establecer un diagnóstico. En veterinaria el uso se restringe a medida del tiempo de la enfermedad (Aubry et al., 2001).

El periodo de tiempo desde los primeros síntomas hasta la muerte puede ser breve, en 24 horas, demuestra su letal naturaleza y su habilidad de engañar las defensas del hospedero (Brickell et al., 1998).

Las lesiones y los signos clínicos de la pasteurelosis son moderados en todas las vaquillas, sólo presentan signos trascendentes como pirexia y dolor para respirar en la mayoría de las vaquillas infectadas (Dowling et al., 2002). Los periodos de incubación fluctúan desde los 2 hasta los 14 días después de la aparición del factor predisponente (Jaramillo et al., 1999). Los signos clínicos y la extensión de las lesiones pulmonares son mucho más severos cuando se involucra *P. haemolytica* que las producidas por *P. multocida* por sí sola (Pijoan et al., 1999). Cuando se encuentra en el pulmón *M. haemolytica* elabora productos tóxicos que dan como resultado una pleuroneumonía fibrinonecrótica. Los animales afectados muestran disnea, depresión, tos y descarga nasal la mortalidad ocurre tras 48 horas de haberse observado los signos iniciales, en casos severos, la mortandad puede alcanzar un 10 % (Highlander et al., 2001).

En muchos sistemas, el ritmo respiratorio es considerado ser parte integral de los

signos clínicos en vaquillas con enfermedad respiratoria. Como sea, la frecuencia respiratoria y los signos clínicos son una medida subjetiva. La respiración, la temperatura rectal y los signos clínicos no predicen el porcentaje de la consolidación o infección bacterial (Reeve *et al.*, 2001).

La fiebre de embarque ocurre frecuentemente entre el ganado después del transporte y se caracteriza por fiebre, tos, disnea y descarga nasal (Graham y Reggie, 2002; Storz *et al.*, 2000).

En humanos la neumonía es la manifestación más común de infección respiratoria causada por *Pasteurella*, y los pacientes pueden presentar agudamente o insidiosamente fiebre, disnea, y pleuritis (Chen *et al.*, 2002).

### 2.3.1. Lesiones

Especies de *Pasteurella* y *Mannheimia* juegan un papel importante en la aparición de bronconeumonías en becerros por el incremento de la severidad del daño al pulmón (Reeve *et al.*, 2001).

En las neumonías causadas por *P. multocida* las lesiones observadas en el pulmón varía de una moderada a una severa bronconeumonía purulenta multifocal con tendencia a abcedativa. Los descubrimientos son una necrosis coagulativa (Dowling *et al.*, 2002). *P. multocida* es también ocasionalmente la causa de mastitis y abortos (Davies *et al.*, 2004).

*Mannheimia haemolytica* puede actuar como patógeno primario e inducir neumonías severas en vaquillas (Reeve *et al.*, 2001).

La neumonía es la mayor característica de *M. haemolytica*. Esta enfermedad se caracteriza por una neumonía exudativa lobular y necrosis en que la fibrina usualmente predomina en el exudado dejando una secuela común de pleuritis fibrinosa (Sarasola *et al.*, 2002; Hazirolu *et al.*, 2001).

*Mannheimia haemolytica*, provoca una severa respuesta inflamatoria en los

pulmones de rumiantes (Caverly et al., 2003). La pasteurolosis neumónica bovina (fiebre de embarque) se caracteriza por una neumonía fibrinonecrosante (Lee et al., 2000; Fedorova et al., 2000; Malazdrewich et al., 2001) aguda con leucocitos polimorfonucleares (PMNs) infiltración de neutrófilos de sangre periférica en las vías aéreas más pequeñas y alvéolos (Leite et al., 2002) estallamiento de alvéolos dentro del pulmón, acumulación de fibrina, edema en el alvéolo, hemorragias y trombosis vascular. En la pasteurelosis se ha demostrado una marcada infiltración de neutrófilos hacia los alvéolos en las primeras horas después de la inoculación bacterial (Lafleur et al., 1998).

Esas infiltraciones se asocian con necrosis del parénquima, la cual por lo menos en parte ha sido causada por productos bacteriales como leucotoxinas, lipopolisacaridos, polisacáridos y constituyentes de neutrófilos (Ackermann et al., 1999). El daño mediado por los neutrófilos puede ser severo siendo capaz de destruir la barrera protectora y la inmunidad innata provista por la mucosa respiratoria (Caverly et al., 2003).

Los lipopolisacaridos (LPS) se encuentran generalmente asociados a la célula bacteriana pero en las infecciones, ha podido detectarse en forma libre en las lesiones pulmonares. Se considera uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria, las lesiones que induce consta de grandes áreas de hiperemia y edema que abarcan el área de la lesión y parte de los lóbulos adyacentes, también pueden observarse áreas de hemorragia y adherencias fibrinosa (Jaramillo et al., 1999). Estos eventos son consecuencia del daño al endotelio vascular inducido por el macrófago activado y por la liberación de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral, interleucina, leucotrienos y ácido araquidónico (Jaramillo et al., 1999).

La necrosis coagulativa es una lesión característica de las neumonías experimentales y las ocurridas naturalmente en vaquillas con *Pasteurella haemolytica*. También la necrosis se ha reportado en pulmones neumónicos provocado por otros organismos. Así no sólo *Mannheimia haemolytica* causa lesiones necróticas en pulmones de vaquillas con neumonía naturalmente

adquirida (Hazirolu *et al.*, 2001).

## 2.4. Patogenia.

Se conoce muy poco acerca de la patogénesis de la neumonía bovina causada por la *P. multocida* a diferencia de la pasteurolosis neumónica causada por *P. haemolytica*. Una de las razones es que se carece de un modelo experimental reproducible. Como sea, en general se tienen muy pocos estudios para entender la epidemiología y las bases moleculares de virulencia de *P. multocida* asociadas con neumonías en bovinos (Davies *et al.*, 2004).

Por otra parte existen factores predisponentes que contribuyen y facilitan la infección pulmonar por *M. haemolytica*. Entre estos se incluyen aspectos ambientales como cambios bruscos de temperatura, humedad elevada, ruido excesivo, hacinamiento, fatiga; aunados a prácticas de manejo como trasquilas, etcétera. Además de los factores ambientales se sabe que existen interacciones entre diversos agentes infecciosos que también facilitan la colonización pulmonar por *M. haemolytica*. Entre estos agentes se encuentran virus como *Parainfluenza-3*, virus respiratorio sincitial, adenovirus, *Mycoplasma spp* y *Chlamydias* (Argueta *et al.*, 1988).

Los virus son los desencadenantes de la inmunosupresión del hospedero el cual permite que la *Pasteurella*, que es un comensal normal, tenga acceso al tracto respiratorio bajo, en donde se vuelve patógeno produciendo una neumonía fibrinonecrótica multifactorial (Highlander *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000).

La patogenicidad de *Mannheimia haemolytica* esta marcada por una rápida replicación, subsecuente a la inhalación del organismo al pulmón, y la expresión de la leucotoxina (Marciel e Highlander, 2001).

Las células con actividad fagocitaria representan la principal línea de defensa contra *M. haemolytica*, pero como resultado de un comensalismo evolutivo, la bacteria ha desarrollado estrategias que le permiten evitar los efectos

antibacterianos de estas células; uno de dichos mecanismos es la liberación de una exotoxina o leucotoxina (Jaramillo et al., 1999) lo cual se sabe, juega un papel en la patogénesis de la pasteurelisis neumónica, promoviendo la proliferación bacteriana matando o incapacitando los diferentes tipos de leucocitos de rumiantes, como macrófagos alveolares, monocitos, neutrófilos, linfocitos, células cebadas y plaquetas. (Davies et al., 1997).

Los efectos citotóxicos de *M. haemolytica* conducen a la fácil colonización y establecimiento de *P. haemolytica* infectando los pulmones (Zamri-Saad y Mera, 2001).

Los productos de los neutrófilos tienen la capacidad de dañar el tejido pulmonar y las citocinas derivadas de neutrófilos son capaces de incrementar la respuesta inflamatoria reduciendo la ventilación alveolar y el intercambio gaseoso en el pulmón inflamado (Mitchell et al., 2003).

En lugar de eliminar la infección, los neutrófilos movilizados agravan el daño pulmonar, probablemente por experimentar degranulaciones y lisis, resultando en la liberación de mediadores de la inflamación, superoxidasas y enzimas proteolíticas (Wang et al., 1999).

Los constituyentes neutrófilos que potencialmente contribuyen al daño tisular incluyen enzimas tales como elastasa y ácido hidrolasas, así como radicales oxidativos, citoquinas y quimioquinas. Las últimas dos incrementan la respuesta inflamatoria e incitan a la infiltración de más neutrófilos (Ackermann et al., 1999; Leite et al., 2002).

La patogénesis de la pasteurelisis bovina incluye factores de virulencia bacteriana y de inflamación, que en conjunto conducen a fallas respiratorias y a la muerte, estos incluyen leucotoxinas (LKT), endotoxinas (Chin et al., 2000), lipopolisacáridos (LPS), transferrinas (McKerral y Lo, 2002; Sarasola et al., 2002; Leite et al., 2002; Lafleur et al., 1998), polisacáridos capsulares, una proteína de la membrana exterior transferrina-obligatoria (OMP) y una neuraminidasa (Davies et

*al.*, 1997).

Las leucotoxinas (LKT) de *P. haemolytica* producen lisis de macrófagos y neutrofilos poliformonucleares (PMNs), los cuales siguen dañando a las defensas del hospedero contra las bacterias y además promueven la infiltración de PMNs (Chin *et al.*, 2000).

La acumulación local de los PMNs y leucotrienos al sitio de inflamación juegan un rol central en la patogénesis de la pasteurellosis neumónica bovina. Los PMNs liberan grandes cantidades de radicales libres de oxígeno y enzimas proteolíticas, estas marcan el ataque a la bacteria pero cursa con daño al epitelio del bronquio. Las células eucariotas, como los PMNs, pueden morir por dos procesos distintos: apoptosis o necrosis. Cuando los PMNs mueren por necrosis, las células se hinchan y estallan, liberando componentes proteolíticos en los tejidos circundantes incrementando el daño inflamatorio local. Durante el proceso de apoptosis, los organelos citoplasmáticos permanecen intactos. La preservación de integridad de la membrana en la apoptosis de PMNs ayuda a minimizar la inflamación y el subsecuente daño tisular (Chin *et al.*, 2000).

Los eventos fisiopatológicos antes mencionados pueden llevar en muchas ocasiones al choque letal, que se caracteriza por fallas funcionales de órganos vitales, como los riñones y tracto gastrointestinal además del pulmón, debidas a una sobreproducción de mediadores endógenos derivados del sistema inmune, de los cuáles el factor de necrosis tumoral es el más importante (Jaramillo *et al.*, 1999).

## **2.5. Diagnóstico.**

De muestras tomadas inmediatamente de animales que mueren sospechosos de *pasteurellosis* se obtienen cultivos casi puros de *P. multocida* de sangre, corazón, hígado, bazo, medula ósea y pulmón. La precisa detección en el laboratorio de *P. multocida* o *M. Haemolytica* depende del aislamiento e identificación de las colonias bacterianas sospechosas, por el microscopio y pruebas bioquímicas. Sin

embargo, el aislamiento de *P. multocida* puede ser difícil durante los estudios de campo cuando se toman las muestras de nariz y garganta del animal portador en un sitio contaminado. Se requiere un extenso subcultivo para obtener un cultivo puro del organismo causal. (Townsend *et al.*, 1998).

Bajo condiciones de campo en países en desarrollo, la oportunidad de contar con un laboratorio es a menudo limitada. El retraso en la recolección o en el proceso de la muerte bacteriológica puede dar como resultado la muerte del organismo o no crecer por la contaminación de la muestra. Debido a esto el diagnóstico a menudo se hace basándose en la historia clínica y en los hallazgos posmortem (Brickell *et al.*, 1998).

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas de diferenciación entre los géneros *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Pruebas	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
Oxidasa	Positiva	Positiva
TSI	Reacción de acidez	Reacción de acidez
Motilidad	Negativo	Negativo
Gucosa	Positiva	Positiva
Hemólisis	Positivo	Negativo
Crecimiento en MacConkey	Positiva	Negativo
Reducción de nitratos	Positivo	Positivo
Indol	Negativo	Positivo
Urea	Negativo	Negativo

### 2.5.1. Pruebas serológicas de Identificación.

Se han usado varios métodos serológicos para la tipificación de *P. haemolytica*. 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 *P. haemolytica* (Fodor *et al.*, 1996).

## 2.6. Epizootiología.

*M. haemolytica* A1 es el agente bacteriano primario de la pasterelosis o la fiebre de embarque (Highlander *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999). En México los serotipos aislados de *P. haemolytica* a partir de pulmones neumónicos de bovinos fueron: A1 (68 %), A2 (14 %) y no tipificables (18 %) (Trigo, 1991).

Los procesos neumónicos en becerras son un grave problema en diversos establos de la región de Tijuana, México, en las que figuran como principales agentes bacterianos causales a *M. haemolytica* A1 y *P. multocida* A (Pijoan *et al.*, 1999).

*P. haemolytica* es el agente más frecuente en el Reino Unido (Blanco *et al.*, 1993). En el Perú, no se disponen de datos oficiales sobre síndromes neumónicos, pero sin lugar a dudas éstos han aumentado significativamente en los últimos años constituyendo el problema principal en explotaciones bovinas (Zanabria *et al.*, 2000).

En el Norte de América *P. multocida* serogrupo B es raramente aislado en el ganado (Dabo *et al.*, 1997). En contraste la *pausterelosis* neumónica es una enfermedad infecciosa importante del ganado en Europa y el Norte de América (Davies *et al.*, 2004).

La septicemia Hemorrágica sucede casi exclusivamente en el ganado y en el búfalo de agua (Tomer *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2004) y recientemente en porcinos (Townsend *et al.*, 1998) es una enfermedad aguda fatal, endémica en Asia y África (Brickell *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2004) y en la India tiene reportado ser la más fatal de las septicemias e importantes enfermedades epizooticas (Tomer *et al.*, 2002). Es causada por *P. multocida* serotipos B: 2,5 (Aislados en Asia) y E: 2,5 (Aislados en África) (Shah *et al.*, 2001; Tomer *et al.*, 2002; Brickell *et*

*al.*, 1998; Davies *et al.*, 2004).

Durante las investigaciones taxonómicas de organismos obtenidos de neumonías en ganado de Dinamarca por evaluación bacteriológica de rutina fueron *Pasteurella multocida* (Bisgaard *et al.*, 1991).

### 2.6.1. Hospederos.

Los miembros del género *Pasteurella* son patógenos reconocidos de muchas especies de animales (Blackall *et al.*, 2002), incluso de caballos, y la mayoría se consideran como comensales o patógenos oportunistas (Kuhnert *et al.*, 2004), están frecuentemente asociadas con enfermedades respiratorias pero también tienen la habilidad de causar diferentes enfermedades en el hospedero (Jaworski *et al.*, 1998).

La *Pasteurella multocida* es un patógeno oportunista de animales silvestres y domésticos así como del hombre (Dowling *et al.*, 2002). El reservorio de *Pasteurella multocida* parece estar limitado al ganado a diferencia de *P. canis* y *avium* que esta asociado con perros y aves respectivamente. *P. multocida* tiene la habilidad de colonizar la mucosa nasal del cerdo y se ha mostrado la adherencia al epitelio de la mucosa de nasofaringe de conejos (Ruffolo *et al.*, 1997).

*Mannheimia haemolytica* es parte de la microflora comensal nasofaringea en animales sanos. Se ha reportado crecimiento in vitro de *M. haemolytica* de aislamientos de la flora normal nasofaringea de los bovinos (Graham y Reggie, 2002). Se aíslan las especies de *Mannheimia* predominantemente de rumiantes (Kuhnert *et al.*, 2004), incluyendo cabras, bisontes y borregos cimarrón (Highlander *et al.*, 2001).

El biotipo A se encuentra frecuentemente presente en neumonías de ovinos y bovinos (Colín *et al.*, 1987). Los gatos tienen la proporción más alta de colonización orofaríngea por la *P. multocida* (50 al 90 %), seguido por los perros (50 al 66 %), cerdos (51 %), y ratas (14 %). Esta distribución se refleja por la

mayor oportunidad de aislar *Pasteurella* de las mordeduras del gato (50 %) que de las mordeduras del perro (20 a 30 %), aunque las mordeduras del perro son mucho más comunes (Chen *et al.*, 2002).

### 2.6.2. Transmisión.

El ganado sano comúnmente tiene *M. haemolytica* A2 en el tracto respiratorio alto, pero secundando al estrés o a una infección viral, el serotipo A1 rápidamente reemplaza al A2 como principal serotipo. Esto puede sugerir que la transmisión es horizontal transmitida por animales que son diseminadores del organismo A1 mediante secreciones nasales. La bacteria puede ser aspirada hasta el pulmón o puede ser diseminada a través de gotitas de animal a animal (Highlander *et al.*, 2001).

### 2.6.3. Mortalidad y Morbilidad.

La neumonía tiene importantes efectos en la industria del ganado bovino, morbilidad y mortalidad así como pérdidas económicas (Marciel y Highlander, 2001). La morbilidad es alta debido a la substancial pérdida de peso, obstrucción de los bronquiolos debido al exudado fibrinoso y la deposición de los detritos necróticos, acumulación de macrófagos y fibrina en los alvéolos y subsecuentemente trombosis y distensión basal linfática (Graham y Reggie, 2002).

La mayor causa de muertes es por pasteurelisis, una aguda neumonía fibrinosa aguda que aparece después de transportar el ganado (Reggie, 2001). La neumonía producida por *P. haemolytica* tiene una morbilidad del 5 al 20%, mientras que la mortalidad varía del 5 al 20% (Jaramillo *et al.*, 1999).

## 2.7. Zoonosis.

La primera infección en un ser humano se describió en el año 1941. Desde entonces son cada vez más numerosas las series de casos encontrados en la

literatura. Existe claramente una población susceptible que son aquellos pacientes con enfermedades crónicas subyacentes, como la diabetes mellitus, neoplasias hematológicas y viscerales, lupus eritematoso crónico, bronquitis crónica, SIDA, e insuficiencia renal crónica (Huerta *et al.*, 2004).

De más de 17 especies de *Pasteurella* conocidas *Pasteurella multocida subsp. multocida*, *Pasteurella multocida subsp. séptica*, *Pasteurella canis*, son los patógenos más comunes en los humanos (Chen *et al.*, 2002).

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

*M. haemolytica* se ha relacionado ocasionalmente a infecciones en humanos, pero esos reportes han sido reconocidos como una gran fuga al entendimiento de que el organismo tiene especificidad de especie por sus mecanismos de virulencia. Ocasionalmente *M. haemolytica* se ha citado en textos médicos, donde puede ser confundida con *P. multocida* que puede transmitirse a humanos (Highlander *et al.*, 2001).

## **2.8. Control y tratamiento.**

En México existe muy poca información confiable sobre los niveles de resistencia antimicrobiana en *Pasteurellas*. Aunque el complejo respiratorio bovino (CRB) puede iniciarse por una variedad de agentes patógenos, debido a la importancia que revisten *M. haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus* como los microorganismos que producen las principales lesiones pulmonares, la terapia antibiótica debe concentrarse en combatir estos tres agentes (Pijoan *et al.*, 2000).

La tilmicosina (TIM) es un macrolido antibiótico sintetizado de la tylosina, este es un antibacterial de espectro antibacterial similar al del fármaco progenitor, pero mas eficaz contra *Pasteurella multocida* y *P. haemolytica*. TIM ha sido exitosamente usado durante toda la década pasada como tratamiento de neumonía en ganado, corderos y ayes, como preventivo y tratamiento de enfermedades respiratorias, ha sido permitido su uso en ganado, ovejas, cerdos y pollos. En 1999 su uso se extendió a conejos como tratamiento contra pasteurelosis (Montesissa *et al.*, 2004).

La tilmicosina induce a la apoptosis de los neutrófilos. La eficacia de la Tilmicosina en el tratamiento de pasteurelosis neumónica se ha atribuido a su farmacodinamia. La tilmicosina puede reducir la inflamación pulmonar en becerros con neumonía. Algunos macrolidos pueden tener propiedades antiinflamatorias al reducir la acumulación de células inflamatorias como PMNs, leucocitos mononucleares y linfocitos; disminuyendo la función secretoria de las células secretorias de las vías aéreas; incrementando la motilidad ciliar del epitelio; y reduciendo la síntesis epitelial de citoquinas (Chin *et al.*, 2000).

Se han usado Tetraciclinas para el tratamiento y la prevención de enfermedades en los que pasteurella están involucrado (Kehrenberg *et al.*, 1998).

### **2.8.1. Resistencia.**

Varios autores han reportado una alta proporción de cepas de *Pasteurella* resistentes a antimicrobianos. Este problema es por el uso de estos productos por los ganaderos sin prescripción veterinaria, promoviendo el desarrollo y la dispersión de la resistencia microbiana (Clavijo *et al.*, 2002). La resistencia a agentes antimicrobianos es muy grande en *M. haemolytica*. Algunas de estas resistencias es por el uso desmedido de antibióticos como suplementos en la alimentación del ganado, ambos por profilaxis y promoción del crecimiento (Highlander *et al.*, 2001).

Los estudios de resistencia de tetraciclinas en aislamientos de *P. multocida* y *P. haemolytica* revela porcentajes altos de resistencia a tetraciclinas (Kehrenberg et al., 2003).

Varios autores han reportado niveles de resistencia superiores al 80 % para estreptomicina (Clavijo et al., 2002).

### **2.8.2. Profilaxis.**

Actualmente se han desarrollado diversos inmunógenos para prevenir las neumonías por *P. hemolytica* en rumiantes con resultados aparentemente satisfactorios, en algunos casos, utilizando como antígenos: bacteria viva, bacteria muerta, material capsular, extractos bacterianos y leucotoxina cruda, además de probar rutas de administración como la oral y usar adyuvantes sintéticos (Jaramillo et al., 1997).

Hay evidencia que la membrana proteica exterior de *P. multocida* tiene potencial como candidato para crear una vacuna (Davies et al., 2004). La leucotoxina ha sido señalada como el principal factor de virulencia de *P. haemolytica*, y el desarrollo del estudio de la vacuna se ha enfocado a la leucotoxina como un importante antígeno de protección (Fedorova et al., 2000).

La estrategia más utilizada para prevenir las infecciones debidas a *Pasteurella multocida* a sido la aplicación de bacterinas, con las cuales se consigue una buena protección frente a la misma cepa pero no frente a distintos serotipos (Boch, 2003).

### **3. Justificación.**

De acuerdo a los antecedentes descritos, no hay revisiones que nos indiquen estudios similares al presente en nuestra región, por lo cual en esta investigación se propone iniciar un conjunto de trabajos que permitan esclarecer los problemas neumónicos que traen consigo grandes pérdidas económicas y la forma de

controlarlos y así reducir los costos en la producción. Tomando en cuenta que a la necropsia se observan una gran cantidad de lesiones que frecuentemente no se manifiestan clínicamente, por lo cual es importante investigar por medio, de microbiología los agentes involucrados en cada caso, y considerando estos hechos, la finalidad del presente trabajo es determinar la frecuencia de aislamientos de *M. haemolytica* y *P. multocida*, en pulmones neumónicos recolectados en rastro.

#### **4. Objetivos.**

1. Identificar aislamientos de *Pasteurella multocida* y/o *Mannhemia haemolytica* a partir de pulmones con lesiones neumónicas de bovinos Holstein, obtenidas en el rastro municipal de, Gómez Palacio, Dgo.
2. Determinar la frecuencia de aislamientos de *Pasteurella haemolytica* y/o *Mannhemia haemolytica* a partir de pulmones con lesiones neumónicas de bovinos Holstein, obtenidas en el rastro municipal de, Gómez Palacio, Dgo.

#### **5. Material y Métodos.**

##### **5.1. Toma de muestras.**

Se revisaron 1288 muestras de pulmones de bovinos recién sacrificados y se tomaron muestras de 56 pulmones con lesiones macroscópicas sugestivas de procesos neumónicos, en el rastro municipal de Gómez Palacio, Durango.

Se determinó el área de pulmón afectada mediante una inspección visual. Se recolectó una muestra de la zona con lesión y se colocó en un recipiente que se mantuvo en refrigeración hasta su procesamiento.

##### **5.2. Estudio bacteriológico.**

Las muestras recolectadas se utilizaron para realizar cultivos bacteriológicos, cada

muestra fue tomada con pinzas estériles, se colocó sobre una caja de Petri y se procedió a esterilizar la superficie de la muestra de pulmón por medio de una espátula caliente al rojo vivo, se cortó con tijeras estériles para obtener a partir de esta área una muestra de tejido de la porción inmediata inferior a la superficie quemada. Con esta muestra se procedió a hacer la siembra en una caja de Petri con agar sangre.

Cada muestra se incubó por 24 horas a 37 °C, después de este tiempo se procedió a separar las colonias sugestivas a *Pasteurella multocida* o *Mannheimia haemolytica*, según sus características. Se resembraron las colonias en otra Caja Petri con agar sangre las cuales se incubaron durante otras 24 horas, para obtener un cultivo puro. Se procedió a hacer una prueba de oxidasa para obtener reacción positiva. A continuación se hicieron frotis y se tiñeron por medio de la tinción de Gram para su identificación morfológica. Una vez identificadas se les hizo pruebas bioquímicas sembrándolas en Triple azúcar y hierro (TSI), Citrato de SIMONS, Indol, Urea.

Una vez identificadas se separaron las cepas de *Pasteurella multocida* y *Mannhemia haemolytica*. Se procedió a sembrarlas en viales con infusión cerebro corazón para su conservación en congelación.

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

### **5.3. Pruebas bioquímicas de identificación.**

**Oxidasa (Método de Kovacs).** Esta prueba se realiza a todos los bacilos Gram negativos. El objetivo es determinar la producción de la enzima citocromo oxidasa.

**Medios y reactivos.** Se impregna un trozo de papel filtro (7 cm de diámetro) con 2 a 3 gotas de solución acuosa al 1% de di-clorhidrato de tetrametil p-fenil-diamina.

**Mecanismo.** Las bacterias que producen oxidasa son capaces de oxidar el

reactivo, con la consecuente aparición de color.

**Interpretación de resultados.** Utilizando un asa de platino o un asa de vidrio se toman colonias del microorganismo a probar y se frota las colonias sobre la superficie. La aparición de un color púrpura intenso en 10 segundos indica una prueba positiva. Reacciones tardías deben ser ignoradas. Una prueba negativa estará indicada por cualquier otro color o ausencia de color.

**Citrato de SIMMON.** El objetivo de esta prueba es determinar la capacidad bacteriana para utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono.

**Medios y reactivos.** Se utiliza un agar que contiene 0.2% de citrato de sodio, al cual se le adiciona un indicador de pH (azul de bromotimol).

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

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

#### **Interpretación de resultados.**

Prueba positiva: Cambio del medio a color azul.

Prueba negativa: El medio permanece verde.

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

**Medios y reactivos.** Se utiliza el medio SIM, al cual después del desarrollo bacteriano, se le agrega el reactivo de Kovacs (150 ml de alcohol isoamílico, amílico o butílico con 10 g de p-dimetil amino benzaldehído, a los que se adicionan 50 ml de ácido clorhídrico concentrado).

**Mecanismo.** La triptofanasa hidroliza el triptofano con la liberación de anillos indólicos. La adición del reactivo de Kovacs detecta estos anillos indólicos libres y por lo tanto indirectamente la producción de la enzima triptofanasa por parte de la bacteria.

Se inocula el medio de SIM por picadura con un asa recta (2/3 partes del tubo) e incubar de 24 a 48 horas a 37 °C.

**Interpretación de resultados.** Se agrega 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.

**Triple Azúcar Hierro. (TSI).** Prueba para diferenciar entre géneros de bacilos Gram negativos entéricos (Familia Enterobacteriaceae) y otras bacterias.

**Objetivo.** Determinar la capacidad para determinar azúcares, producción de ácido sulfhídrico y producción de gas por fermentación.

**Medios y reactivos.** El medio de TSI contienen agar, peptonas y sales minerales; tres azúcares; glucosa, lactosa y sucrosa; tiosulfato de sodio, sulfato ferroso y rojo de fenol como indicador de pH.

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

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

**2. Producción de gas.** Algunos microorganismos producen gas como resultado de la fermentación de algunos carbohidratos. Esta reacción se observa en el medio por la presencia de huecos, burbujas en el agar o incluso el desplazamiento del agar en el tubo por acción del gas que lo empuja.

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

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

**Incubación.** De 18 a 24 horas como máximo. El prolongar la incubación puede dar lugar a lecturas falsas, ya que algunas reacciones pueden revertirse. Para efectuar la lectura de producción de H<sub>2</sub>S, puede incubarse adicionalmente hasta 40 horas. Cuando no existe un buen crecimiento tanto en el fondo como en la superficie los resultados deben tomarse con reserva.

Interpretación de resultados.

Superficie	Amarillo (acidez)
Fondo	Amarillo
Gas	-
H <sub>2</sub> S	-

**Urea.** Para diferenciar entre especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Para diferenciar *Proteus* de otros géneros. Útil para la diferenciación rápida de *Pasteurella ureae*, *Corynebacterium renale* y *Brucella* spp.

**Objetivo.** Determinar la habilidad de las bacterias de producir la encima ureasa que desdobla la urea en amoníaco.

**Medios y reactivos.**

**A) Método en caldo.** Caldo amortiguado neutral de sales minerales, conteniendo

2 % de urea y rojo de fenol como indicador de ph.

**B) Método en agar Christensen.** Medio sólido con base peptonada, glucosa y minerales, contiene urea y el mismo indicador de ph.

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

**Método de siembra.**

**Caldo.** Mediante agitación del asa.

**Agar.** Inocular densamente la superficie del medio o por una estría continua.

**Incubación.**

Caldo: 18 a 24 horas a 37°C.

Agar: Uno a 7 días a 37°C.

**Interpretación de los resultados.**

Caldo.

Prueba positiva: Rojo.

Prueba negativa: Amarillo.

Agar tubo.

Prueba positiva: Rosa intenso.

Prueba negativa: Sin cambio en el medio (Hernández et al., 2003).

## **6. Resultados y Discusión.**

Se revisaron 1288 pulmones, se encontraron 56 (4.34 %) con lesiones pulmonares, de los cuales hubo 10 (17.85 %) aislamientos, 6 (10.71 %), de *Pasteurella multocida* y 4 (7.14 %) de *Mannheimia haemolytica* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* de pulmones con lesiones neumónicas muestreados en el rastro municipal de Gómez Palacio, Dgo.

N	n	Aislamientos	Mh	Pm
1288	56	10 (17.85 %)	4 (7.14 %)	6 (10.71 %)

N = Total de pulmones revisados.  
n = Pulmones con lesiones neumónicas.  
Mh = *Mannheimia haemolytica*.  
Pm = *Pasteurella multocida*.

Pocos son los estudios que muestran la frecuencia de aislamientos de bacterias a partir de pulmones neumónicos, en México. La mayoría de estos estudios son en ovinos y caprinos, sin embargo, en la Cd. de México, se realizó en el rastro un estudio de becerros y encontraron que el 8.9 % de los animales examinados presentaron problemas neumónicos (Jaramillo *et al.*, 1987). En otra investigación realizada en el rastro de Ferrería de la Cd. de México se obtuvieron muestras de pulmones de becerros y se demostró que la prevalencia de neumonías fue del 8.7 %, habiendo una relación estadística significativa entre el aislamiento de bacterias del género *Pasteurella* con la presencia de neumonía (Sánchez *et al.*, 1988), en ambos casos coinciden los resultados y aunque los nuestros son un ligeramente más bajos, nos acercamos a estas investigaciones,

En otras especies se han realizado estudios bacteriológicos, Colín y col. (1987) recolectaron un total de 860 muestras de pulmones neumónicos de ovinos localizados en la zona de Topilejo, DF., así como de ovinos criollos sacrificados en el rastro de Ferrería, DF., los cuales provenían del estado de México. Una porción del pulmón afectado fue sembrada por contacto en agar sangre para posteriormente aislar e identificar a *Pasteurella haemolytica*. De un total de 860 pulmones neumónicos revisados se aislaron 120 cepas (14 %) de *Pasteurella haemolytica*.

Madrigal y col. (1983), estudiaron 286 pulmones de ovinos y caprinos, sacrificados en el rastro de Capulhuac, Estado de México. De los pulmones recolectados, 68 (23.7%) fueron neumónicos y se aisló *Pasteurella haemolytica* en el 7.35% de los

casos.

Martínez (1985), en un estudio realizado en 219 cadáveres de corderos provenientes de 16 explotaciones ovinas del Estado de México; encontraron de 49 muestras de pulmones neumónicos, fueron aisladas 17 (34.7 %) cepas de *P. haemolytica*, 8 (16.3 %) de *P. multocida*. (Trigo, 1986).

En nuestro estudio fueron escasas las alteraciones neumónicas encontradas en bovinos Holstein, en el rastro municipal de Gómez Palacio, Dgo, y la frecuencia de aislamientos de *P. multocida* y *M. haemolytica* fue muy baja, sin embargo muy similares a los encontrados por Colín y col. (1987) y madrigal y col. (1983).

## **7. Conclusión.**

Son escasas las investigaciones similares a la presente, por lo cual es un antecedente para futuros trabajos. Estos tipos de estudios en bovinos Holstein son recientes y se considera importante darle continuidad a la presentación de casos clínicos a nivel de campo.

Los resultados obtenidos nos indican realmente el desecho de animales por problemas neumónicos no es considerable, de acuerdo a los hallazgos en este trabajo, probablemente por que en la región lagunera, donde se realizó esta investigación, es frecuente la vacunación de los animales desde los primeros dos meses de edad.

## 8. Literatura citada.

1. Ackermann, R.M., Brogden K.A., Florance F.A., and Kehrl E.M. (1999). Induction of CD18-Mediated Passage of Neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in Pulmonary Bronchi and Bronchioles. *Infection and immunity*. 67: 659–663.
2. Angen, Ø., Ahrens P., Bisgaard M. (2002). Phenotypic and genotypic caracterización of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-ike strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet. Microbiology*. 84: 103-114.
3. 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.
4. Argueta, J., Mercado, P.M., Trigo, T.F. (1988). Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. *Vet. Méx.* 19: 93-97.
5. Aubry, P., Warnick D.L., Guard L.C., Hill, W.B., Witt, F.M. (2001). Health and performance of young dairy calves vaccinated with a modified-live *Mannheimia haemolytica* and *Pasteuralla multocida* vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 219: 1739-1742.
6. Bisgaard, M., Houghton S.B., Mutters, R. and Stenzel. (1991). Reclassification of German, British and Dutch isolates of so-called *Pasterurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. *Vet. Microbiology* 26: 115-124.

7. Blackall, P.J., Angen Ø., Fegan, N., Blackall, L.L. Mutters, R., and Bisgaard M. (2001). Characterisation of a novel *Mannheimia* sp from Australian feedlot cattle. *Aust Vet.* 79: 634-639.
8. Blackall P. J., Bisgaard, M., and Stephenes. (2002). Phenotypic characterisation of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aust Vet J.* 80: 87-91.
9. Blanco V.F.J., Trigo, T.F., Jaramillo M.L., Aguilar R.F., Tapia P.G., Suárez, G.F. (1993). Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet. Méx.* 24(2): 107-126.
10. Boch Gallego Montserrat. (2003). Caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *P. multocida*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Barcelona. 27.
11. Bosch, M, Garrido, M.E., Pérez, A.M., Rozas, B.I., Barbé J., Llagostera, M. (2004). *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet. Microbiology.* 99: 103-111.
12. Brickell, S. K., Thomas, L.M., Long, K.M., Panaccio, M., Widders, P.R. (1998). Development of a PCR test based on a gene region asociate with the pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2, the casual agente of Haemorrhagic Septicaemia in Asia. *Vet. Microbiology.* 59: 295-307.
13. Caverly, M.J., Diamond, G., Gallup, M.J., Brogden, K.A., Dixon, A.R., and Ackermann, R.M. (2003). Coordinated Expression of Tracheal Antimicrobial Peptide and Inflammatory-Response Elements in the Lungs of Neonatal Calves with Acute Bacterial Pneumonia. *Infection and immunity.* 2950-2955.

14. 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.
15. Chin A.C., Lee, W.D., Murrin, K.A., Morck, D.W., Merril, K.J., Dick, P., and Buret, G.A. (2000). Tilmicosin Induces Apoptosis in Bovine Peripheral Neutrophils in the Presence or in the Absence of *Pasteurella haemolytica* and Promotes Neutrophil Phagocytosis by Macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(9): 2465-2470.
16. Clavijo, A.M; Alfaro, C, M Díaz, C; Santander, J. Y Coa, P. (2002). Resistance and sensibility to antimicrobials in *Pasteurella multocida* strains isolated from calves with neumonía in Monagas state, Venezuela. *Rev. Científica*. XII: 626-629.
17. Colín, F.R., Jaramillo M.L., Aguilar RF., Trigo, T.F., Merino, M. (1987). Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev. Lat-amer. Microbiol*. 29: 231-243.
18. Dabo, S.M., Confer, G.L., Murphy. (1997). Outer membrana proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Vet. Microbiology*. 54: 167-183.
19. 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. *Vet. Microbiology*. 150(12): 4199-4210.
20. Davies, R.L, Arkinsaw S., and Selander, K.R. (1997). Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep. *Infect Immun*. 65(9): 3585-3593.

21. Davies, R.L., MacCorquodale, R., Relly, S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiology*. 99: 145-158.
22. Dowling, A., Hodgson, J.C., Schock, A., Donachie, W., Eckersall, P.D., Mckendrick I.J. (2002). Experimental inducción of pneumonic pasteurellosis calves by intratracheal infección with *Pasteurella multocida* biotipo A:3. *Research in Vet. Science*. 73: 37-44.
23. Fedorova, D.N., Highlander, S.K., Dusek, M.D., Panciera, R., Alvarez, E.L., and Rinehart, C. (2000). Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* Leukotoxin Causes Partial Attenuation of Virulence in a Calf Challenge Model. *Infection and immunity*. 68: 3916-3922.
24. Fodor, L., Penzes, Z., and Varga, J. 1996. Coagglutination test for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol*. 34(2): 393-397.
25. García, H.G., Trigo, T.F., Sánchez M.P., Aguilar, F.R. (1988). Serotipos de *Pasteurella multocida* en bovinos productores de carne en México. *Vet. Méx*. 19: 199-202.
26. Graham, M.R., Reggie Y. C. Lo. (2002). A putative iron-regulate Ton B-dependen receptor of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1: possible mechanism for phase variation. *Vet. Microbiology* 84: 53-67.
27. Gutiérrez, P.J., Aguilar, R.F., Suárez G.F., Hernández, C.R. (2003). Bacilos Gram Negativos Asociados al Aparato Respiratorio. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Microbiología Veterinarias. UNAM. 92-94.
28. Hazirolu, R., Diker, K.S., Gulbahar, M.Y., and Kul, O. (2001). Inmunoperoxidase examination of pneumonic bovine lungs naturally infected with *Pasteurella haemolytica*. *Israel Vet. Medical Assoc*. 56:

29. Hernández, S.G., Mojica, M., Rodríguez, R.A., Rodríguez, S.C., Segundo, Z.C. (2003). Procesamiento y Diagnóstico Bacteriológico y Micológico de Muestras Clínicas. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Microbiología Veterinarias. 139-158.
30. Highlander, K.S. (2001). Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Frontiers in Bioscience*. 6: 1128-1150
31. Highlander, K.S., Fedorova, D.N. (2000). Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* Leuckotoxin Causes Partial Attenuation of Virulence in a Calf Challenge Model. *American Soc. for Microbiology* 68: 3916-3922.
32. Huerta, B.M., Aviles, A.J., Bueno, C. Longol, M.I., Suárez, R., Lázaro, P. (2004). Infección de tejidos blandos por *Pasteurella multocida*. *Med. Cut. Lat. Am.* 32: 135-136.
33. Hunt, L.M., Ben, A., Townsend, M.K. (2000). The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiology* 72: 3-25.
34. Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Trigo, T.F., (1987). Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. *Vet. Méx* 18: 185-188.
35. Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Morales, A.F., Trigo, T.F., Suárez, G. (1997). Evaluación de la protección contra la pasteurelisis neumónica de *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet. Méx.* 28: 221-228.
36. Jaramillo M.L., Aguilar F.R., Trigo T.F. (1987). Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. *Vet.*

Méx.18: 185-188.

37. Jaramillo, M.L., Zenteno, E., Trigo T.F. (1999). Mecanismos de Patogenicidad y Adherencia de *Pasteurella haemolytica*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 41: 105-116.
38. Jaworski, M.D., Hunter, D.L., Ward, A.C.S. (1998). Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 49-55.
39. Kehrenberg Corinna., Werckenthin Christiane., Schwarz Schwarz. (1998). Tn5706, A Transposon-Like Element From *Pasteurella Multocida* Mediating Tetracycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 42(8): 2116–2118.
40. Kehrenberg Corinna., Tham Nga Thi Thu., Schwarz Stefan. (2003). New Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Pasteurella multocida*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 47: 2978–2980.
41. Kodjo, A., Villard, L., Bizet, C., Martel, J., Sanchis, R., Borges, B., Gauthier, D., Maurin, O.K., and Yves., R. (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.
42. 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* 42: 5542–5548.
43. Lafleur, L.R., Abrahamsen, M.S., and Maheswaran, K.S. (1998). The Biphasic mRNA Expression Pattern of Bovine Interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* Lipopolysaccharide-Stimulated Alveolar Macrophages Is

Primarily due to Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infection and immunity*. 66(9): 4087–4092.

44. Lee H.Y., Kehrl, JR., Brogden, A.K., Gallup, M.J., and Ackermann, R.M. (2000). Influence of b2-Integrin Adhesion Molecule Expression and Pulmonary Infection with *Pasteurella haemolytica* on Cytokine Gene Expression in Cattle. *Infection and immunity*. 68: 4274–4281.
45. Leite F., Brien, S.O., Sylte, M.J., Page, T., Atapattu, D., and Czuprynski, C.J. (2002) Inflammatory Cytokines Enhance the Interaction of *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin with Bovine Peripheral Blood Neutrophils In Vitro. *Infection and immunity*. 70: 4336–4343.
46. McKerral L.J. and Reggie Y. C. Lo. (2002). Construction and Characterization of an Acapsular Mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infection and immunity*. 70: 2622–2629.
47. Malazdrewich C., Ames T.R., Abrahamsen M.S., Maheswaran S. K. (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
48. Marciel, M.A., and Highlander, K.S. (2001). *Infection and immunity*. 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
49. Mitchell, G.B., Albright, N.B and Caswell, L.J. (2003). Effect of Interleukin-8 and Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Priming and Activation of Bovine Neutrophils. *Infection and immunity*. 1643-1649.
50. Miranda, A.B., Boyce, DJ., Wilkie, W.I., Adler, B. (2004). Characterization of two lipoproteins in *Pasteurella multocida*. *Microbes and Infection*. 6: 58–67.

51. Montesissa, C., F. Capolongo, A., Biancotto, S.G., Dacasto M. (2004). Metabolism of tilmicosin by rabbit liver microsomas and hepatocytes. *The Veterinary Journal*. 167: 87-94.
52. Pijoan, A.P., 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. Méx.* 31(2): 153-156.
53. Pijoan, A.P., Aguilar, R.F., Morales, A.F. (1999). Caracterización de los procesos neumónicos de becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet. Méx.* 30(2): 149-155.
54. Reeve L., Johnson. (2001). Relationships between clinical and pathological signs of disease in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* Type A1. *Veterinary Record*. 549-552.
55. Reggie Y.C Lo. (2001). Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet. Microbiology*. 83: 23-35.
56. Ruffolo, C.G., Tennent, M.J., Michalski, W.P., and Adler, B. (1997). Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*. 65(1): 339-343.
57. Sánchez, M.H., Morales, A.F., Zepeda, M.O., Espino, R.G., Trigo T.F. (1988). Determinación de anticuerpos anticapsula y anticitotoxina de *Pasteurella haemolytica* en suero de bovinos y caprinos. *Téc. Pec. Méx.* 28
58. Sarasola, P., Lees, P., AliAbadi, S.F., McKellar, A.Q., Donachie, W., Marr, A.K., Sunderland, J.S., and Rowan, T.G. (2002). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profiles of Danofloxacin Administered by Two Dosing Regimens in Calves Infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*.

59. Shah, J., Shah, N.H., Graaf, F.K. (2001). Safety and efficacy of an oil-adjuvant vaccine against haemorrhagic septicemia in buffalo calves: cross-protection between the serotypes B:2,5 and E2.5. *Veterinary Record*. 583-587.
60. Storz, J., Lin, X., Purdy, W.C., Chouljenko, N.V., Kousoulas, G.K., Enright, M.F., Gilmore, C.W., Briggs, E.R. and Loan, W.R. (2000). Coronavirus and *Pasteurella* Infections in Bovine Shipping Fever Pneumonia and Evans' Criteria for Causation. *Journal of Clinical Microb.* 38(9): 3291–3298.
61. Tomer, P., Chaturvedi., Minakshi, Malik, P., and Monga, D.P. (2002). Comparative Analysis of the Outer Membrane Protein Profiles of Isolates of the *Pasteurella multocida* (B:2) Associated with Hemorrhagic Septicaemia. *Vet. Research Communications*. 26: 513-522.
62. Townsend, K.M., Frost, J.A., Lee, C., Papadimitriou, M.J., and Dawkins, H.J.S. (1998). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol*. 36(4): 1096-1100.
63. Trigo, J.F. (1991). Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelisis pulmonar bovina. *Vet. Méx.* 22(2): 131-134.
64. Trigo, J.F. (1986). La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. *Vet. México*. 17: 116-119.
65. Wang, Z., Clarke, R.C., and Clinkenbeard D.K. (1999). Infection and immunity. Role of Phospholipase D in *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin-Induced Increase in Phospholipase A2 Activity in Bovine Neutrophils. *Infection and immunity*. 67(8): 3768–3772.

66. Zamri-Saad, M. and Mera, H. (2001). The effect of *Pasteurella haemolytica* A2 Infection on Phagocytosis Efficiency of caprine broncho-alveolar Macrophages *Vet. Medicine*. 48: 513-518.
67. Zanabria, V., Rivera G.H., Rosadio, A.R. (2000). Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde de Lima. *Rev. Inv. Vet.* 11: 169-187.