

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

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



"FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia haemolytica* Y *Pasteurella multocida* EN BOVINOS HOLSTEIN CLÍNICAMENTE SANOS DE NEUMONÍA EN LA COMARCA LAGUNERA, DURANTE LA TEMPORADA OTOÑO - INVIERNO".

POR:

LUCIO IGNACIO GONZÁLEZ FLORES

T E S I S

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

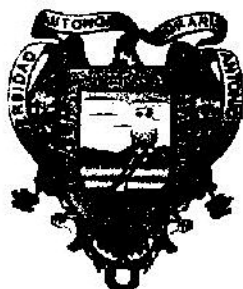
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAH., MÉXICO

SEPTIEMBRE DE 2005

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

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**"FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia haemolytica* Y
Pasteurella multocida EN BOVINOS HOLSTEIN CLÍNICAMENTE SANOS
DE NEUMONÍA EN LA COMARCA LAGUNERA, DURANTE LA
TEMPORADA OTOÑO - INVIERNO".**

T E S I S

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

LUCIO IGNACIO GONZÁLEZ FLORES

ASESOR

M.C.V. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ

COLABORADOR

M.C. CARLOS J. JARAMILLO ARANGO

COLABORADOR

M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

COLABORADOR

M.V.Z. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO

TORREÓN, COAH., MÉXICO

30 DE SEPTIEMBRE DE 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

UNIDAD LAGUNA

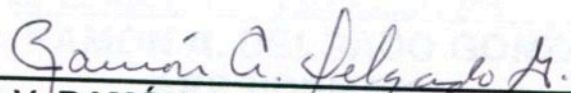
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

"FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia haemolytica* Y *Pasteurella multocida* EN BOVINOS HOLSTEIN CLÍNICAMENTE SANOS DE NEUMONÍA EN LA COMARCA LAGUNERA, DURANTE LA TEMPORADA OTOÑO - INVIERNO".

T E S I S

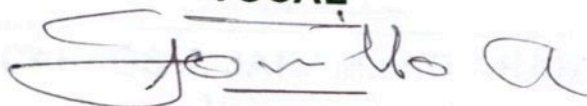
APROBADA POR LOS ASESORES

PRESIDENTE DEL JURADO



M.C.V. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL



M.C. CARLOS J. JARAMILLO ARANGO

**COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE
CIENCIA ANIMAL**


M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

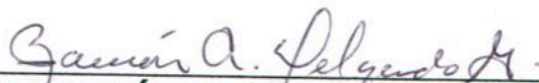


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

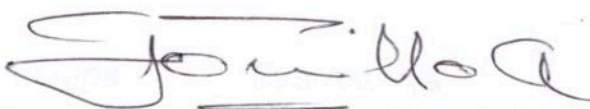
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

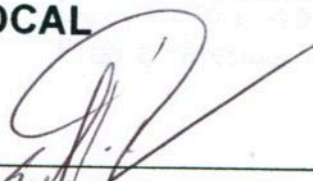
"FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia haemolytica* Y *Pasteurella multocida* EN BOVINOS HOLSTEIN CLÍNICAMENTE SANOS DE NEUMONÍA EN LA COMARCA LAGUNERA, DURANTE LA TEMPORADA OTOÑO - INVIERNO".



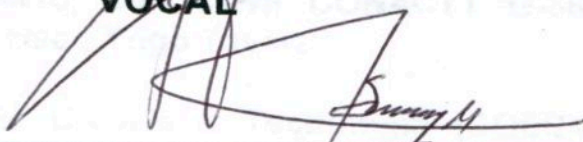
**M.C.V. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ
PRESIDENTE**



**M.C. CARLOS J. JARAMILLO ARANGO
VOCAL**



**M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
VOCAL**



**M.V.Z. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO
VOCAL SUPLENTE**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por darme luz y ganas para salir adelante.

A mis Padres: Por todo su apoyo incondicional.

A mi Alma Terra Mater: Por formarme como profesional.

A mis asesores:

M.C.V. Ramón A. Delgado González

M.C. Carlos J. Jaramillo Arango

M.C. Ernesto Martínez Aranda

M.V.Z. Rodrigo I. Simón Alonso

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

A mis amigos:

Guadalupe Machado Ramos

Abril Morales Almaraz

Yara Ivette Cruz Méndez

Jessica María Flores Salas

Elsa Urquiza Santillán

Dinora Flores Gámez

Eva Astorga

Miguel Ángel García Monroy

Luis Miguel Ayala Escalante

Lizzy Cerda Ayala

Fray B. Mérida Roblero

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.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT) de Coahuila, por haberme otorgado la beca para la realización de la tesis.

DEDICATORIAS

A mis abuelos:

Lucia Aldana Pérez

Prof. Zósimo Flores Tenorio (Q.E.P.D)

Carmen González Hernández (Q.E.P.D)

Gonzalo González Reyes (Q.E.P.D)

A mis padres:

Profra. Lucia Flores Aldana

Lucio Ignacio González González

A mi hermana:

M.C. Erendira González Flores.

III. Resumen.

Se identificaron aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* y se analizó la frecuencia con la que se presentaron, a partir de hisopos nasales obtenidos de bovinos Holstein clínicamente sanos de neumonía en establos de la Comarca Lagunera. El estudio fue de tipo descriptivo, prospectivo y transversal. El muestreo se llevó a cabo en forma aleatoria en 20 hatos tomándose el 2 % del total de cada hato. Se muestrearon animales que no presentaron evidencias clínicas de neumonías. Se obtuvieron muestras de mucosa nasal mediante hisopos estériles, los cuales se sembraron en agar sangre e identificarán con tinción de Gram y pruebas bioquímicas. El análisis de los resultados se realizó mediante estadística descriptiva, a través de frecuencias en relación a edad. Se obtuvieron un total de 737 muestras, 497 correspondieron a animales menores de un 1 año de edad y 240 a animales mayores de 1 año de edad, sobre una población total de 36850 animales. Los resultados obtenidos fueron un total de 137 aislamientos (18.6%); 46 de *Mannheimia haemolytica* (6.2%), 65 aislamientos de *Pasteurella multocida* (8.8%) y 26 de ambas bacterias (3.5%). De acuerdo a estos resultados, es más frecuente encontrar *Pasteurella multocida* que *Mannheimia haemolytica* en clínicamente sanos de neumonía en la Comarca Lagunera. Es conveniente considerar la posibilidad de encontrar una asociación entre ambas bacterias. La posibilidad de hallar *Mannheimia haemolytica* o *Pasteurella multocida* o ambas es mucho mayor en bovinos Holstein clínicamente sanos menores de un año que en los mayores de un año

INDICE DE CONTENIDO

	Página
I. Agradecimientos.	i
II. Dedicatorias.	ii
III. Resumen.	iii
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
2.1. Taxonomía.	3
2.2. Neumonía y otras enfermedades causadas por <i>P. multocida</i> y <i>M. haemolytica</i> .	4
2.3. Signos y lesiones.	7
2.4. Diagnóstico.	8
2.5. Métodos de tipificación para <i>P. multocida</i> y <i>M. haemolytica</i> .	9
2.5.1. Fenotipificación.	9
2.5.2. Serotipificación.	9
2.5.3. Genotipificación.	10
2.6. Patogenia y determinantes de la virulencia de <i>P. multocida</i> y <i>M. haemolytica</i> .	10
2.6.1. Patogenia.	10
2.6.2. Determinantes de la virulencia.	11
2.6.2.1. La cápsula.	11
2.6.2.2. Fimbrias.	12
2.6.2.3. Lipopolisacaridos.	12
2.6.2.4. Leucotoxina.	13
2.6.2.5. Neuraminidasa.	15
2.6.2.6. Sialidasa.	15
2.7. Resistencia antimicrobiana.	16
2.8. Vacunas.	17
3. Justificación.	20
4. Objetivos.	20

5. Marco de referencia.	21
6. Material y métodos.	22
7. Resultados.	23
8. Discusión.	28
9. Conclusiones.	29
10. Literatura citada.	30
11. Anexos.	37
Anexo 1. Cuestionario para la toma de muestras en los diferentes establos.	37
Anexo II. Técnicas de siembras en medios de cultivo utilizadas para la identificación de posibles colonias de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i>	39
Anexo III: Técnica para la realización de frotis.	40
Anexo IV. Tinción de Gram; modificación de Reed.	41
Anexo V. Procedimiento para la preparación de agar sangre para medio de cultivo.	42
Anexo VI. Procedimiento para la preparación de pruebas bioquímicas.	43
Anexo VII.	47

INDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Diferentes especies de <i>Pasteurella</i> , su hospedador, las enfermedades que ocasiona y localización anatómica de donde se ha aislado.	5
Cuadro 2. Diferentes especies de <i>Mannheimia</i> , su hospedador, las enfermedades que ocasiona y localización anatómica de donde se ha aislado.	7
Cuadro 3. Pruebas bioquímicas de identificación que permite la diferenciación entre los géneros <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> .	9
Cuadro 4. Porcentaje de resistencia, sensibilidad media y sensibilidad alta de <i>Pasteurella multocida</i> a diversos antibióticos	18
Cuadro 5. Porcentaje de resistencia, sensibilidad media y sensibilidad alta de <i>Mannheimia haemolytica</i> a diversos antibióticos.	19
Cuadro 6. Relación de establos muestreados en la Comarca Lagunera para el aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en bovinos Holstein clínicamente sanos.	24
Cuadro 7. Aislamientos de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en bovinos Holstein clínicamente sanos.	25
Cuadro 8. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en bovinos Holstein clínicamente sanos mayores de un año.	26
Cuadro 9. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en bovinos Holstein clínicamente sanos menores de un año.	28

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localización de la Comarca Lagunera.	21
Figura 2. Comarca Lagunera de Durango.	22
Figura 3. Comarca Lagunera de Coahuila.	22
Figura 4. Picadura con asa recta.	39
Figura 5. Siembra para aislamiento en cultivo puro.	39
Figura 6. Siembra por picadura en el fondo del tubo y en estria sobre la superficie del medio.	39
Figura 7. Siembra en estria cerrada.	39
Figura 8. Colonias de <i>Pasteurella multocida</i> .	47
Figura 9. Áreas rojas de consolidación y atelectasia con localización anteroventral por <i>Pasteurella multocida</i> .	47
Figura 10. Exudado purulento en bronquios por <i>Pasteurella multocida</i> .	48
Figura 11. Infiltración severa de neutrófilos en bronquiolos por <i>Pasterurella multocida</i> .	48
Figura 12. Migración de neutrófilos del epitelio cilindrico ciliado hacia la luz del bronquiolo.	49
Figura 13. Bronconeumonía fibrinosa causada por <i>Mannheimia haemolytica</i> .	49
Figura 14. Aspecto del corte en un pulmón con bronconeumonía fibrinosa. Nótese las áreas de marmoleo.	50
Figura 15. Aspecto microscópico de un pulmón con bronconeumonía fibrinosa por <i>Mannheimia haemolytica</i> .	50

1. Introducción.

La industria bovina en México es una importante fuente de proteína de origen animal, ya que la leche de origen bovino representa el 98 % del total que se consume en México. En producción de carne en canal ocupa el segundo lugar con el 31 % después de la carne de ave que representa el 43 %. La leche y la carne de origen bovino representan el 67 % de la totalidad de los productos pecuarios para consumo (SAGARPA, 2003).

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 pérdidas económicas a nivel mundial. Se estima que en Estados Unidos y Canadá entre el 80 a 90 % de las becerras se ven afectadas por brotes severos de neumonía, aunque la mortalidad es menor al 5 %, las pérdidas económicas se estiman en \$ 640 millones de dólares anualmente (Argueta, 1988; Pijoan, 1999; Juárez, 2001).

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

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).

Mannheimia haemolytica es la bacteria que con mayor frecuencia se encuentra ya que habita normalmente en las criptas de las tonsilas del bovino sano y, además, es un importante oportunista del tracto respiratorio debido a

que usualmente coloniza la parte alta del mismo (Lo, 2001; Trigo, 1987).

M. haemolytica es una bacteria gram negativa, capsulada, no móvil, de forma cocobacilar, mesofílica, aerobia y anaerobia facultativa, oxidasa positiva e indol negativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas. La presencia de cápsula con propiedades de superficie antifagocíticas, la hacen parcialmente resistente a la fagocitosis, y se han descrito 17 serotipos de esta bacteria (Narayanan, 2002).

Pasteurella multocida aislada con menos frecuencia que *M. haemolytica*, participa de manera importante en el complejo respiratorio de ovinos y bovinos. Es un bacilo gramnegativo que presenta antígenos capsulares y somáticos, por lo cual se le ha clasificado en 5 biotipos (A, B, D, E, F) y 16 serotipos. Es parte de la flora normal del aparato respiratorio y gastrointestinal de diversos animales, es frecuente encontrarla en las heridas humanas producidas por mordeduras de perros y gatos. Produce una bronconeumonía supurativa que tiende a la cronicidad, pero al resolverse deja manifestaciones de cicatrización y abscesos, con frecuencia al momento de la muerte el 50% del pulmón está afectado (Trigo, 1987; González, 2002; Jawetz, 1990).

Las enfermedades respiratorias en bovinos son una importante causa de pérdidas económicas a nivel nacional, y sin embargo, hay pocos estudios que indiquen la situación actual de la frecuencia de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*; de acuerdo a estos datos, se consideró necesario realizar un estudio en la Comarca Lagunera, ya que representa un importante centro de producción de leche bovina a nivel nacional.

2. Antecedentes.

2.1. Taxonomía.

La familia *Pasteurellaceae* representa el subgrupo 3 dentro del grupo 5, de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos según la clasificación de la novena edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Gutierrez et al., 2002). Los microorganismos de la familia *Pasteurellaceae* están en diferentes tipos de animales y la mayoría se considera como comensales o patógenos oportunistas. Se han clasificado nueve diferentes géneros (*Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Lonepinella*, *Phocoenobacter*, *Histophilus*, *Gallibacterium*, y *Volucribacter*) dentro de la familia *Pasteurellaceae* (Kuhnert et al., 2004).

Los microorganismos del género *Pasteurella* y *Mannheimia* son pequeños cocobacilos gram-negativos que se encuentra en el tracto nasofaríngeo y gastrointestinal de muchos animales salvajes y domésticos (Chen et al., 2002). Suelen aparecer aislados o con menor frecuencia en pares o cadenas cortas. Son inmóviles no esporulados anaerobios facultativos, con un metabolismo respiratorio y fermentativo, son oxidasa y catalasa positivos, crecen bien sobre medios de cultivos comunes, aunque lo hacen mejor sobre medios que incorporen suero o sangre (Gutierrez et al., 2003).

El género *Pasteurella*, que fue propuesto por Trevisan en 1887 ha estado sometido a una profunda revisión taxonómica durante los últimos años. En 1982 se propuso la especie de *P. tetudinis*; en 1985, *Pasteurella multocida* se dividió en 3 subespecies (*P. multocida subsp multocida*, *P. multocida subsp. septica*. Y *P. multocida gallicida*). A la vez se crearon 6 nuevas especies (*P. canis*, *P. stomatis*, *P.dagmatis*, *P.anatis*, *P. langaa* denominada a partir de 1998 *P. langaaensis*, y *P. volantium*). En 1989 se describieron *P. caballi*, y *P. granulomatis*; y en 1990, *P. bettyea*, *P. lymphangitidis*, *P.mairii* y *P. trehalosi* (Gutierrez et al., 2002).

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 & Cross en 1932, quienes propusieron el nombre de *Pasteurella haemolytica* para el grupo *Bacillus bovisepiticus* (Angen et al., 1999).

Los biotipos de *P. haemolytica* fueron descritos por Smith. Los biotipos fueron designados A y T, por su habilidad para fermentar arabinosa o trehalosa. Las investigaciones genotípicas demostraron que las cepas positivas a trehalosa representaban una especie diferente (Angen, 1999; Kodjo et al., 1999). Aunque estas cepas no muestran ninguna relación íntima al género *Pasteurella*, fueron nombradas recientemente como *Pasteurella trehalosi* y en lo que se refiere al grupo trehalosa-negativo este representa un nuevo género dentro de la familia *Pasteurellaceae* (Angen et al., 1999). En 1999 se realizó la última modificación taxonómica, cuando en virtud de estudios de hibridación ADN y de secuenciación del ARN ribosómico 16S se derivó del género *Pasteurella* uno nuevo, el género *Mannheimia* (nombre propuesto en honor de W. Mannheim.) que cuenta en la actualidad con cinco especies: *M. haemolytica*, *M. granulomatis*, *M. varigena*, *M. glucosida* y *M. ruminalis* (Angen et al., 1999). La serovariedad A2 de *M. haemolytica*, es normalmente aislada de los casos de pasteurelosis neumónica de ovinos. Aunque también se llegan a encontrar las serovarietades A1, A6 a A9, A11, y A12, que se recuperan mucho menos que la serovariedad A2 (Davies, R. L., et al., 1997). De *P. multocida*, la septicemia hemorrágica en bovinos y búfalos de agua es causada exclusivamente por la serovariedad B2 y E2 (Davies., 2004).

2.2. Neumonía y otras enfermedades causadas por *P. multocida* y *M. haemolytica*.

En humanos la neumonía es la manifestación más común de infección respiratoria causada por *Pasteurella*, y los pacientes pueden presentar insidiosamente fiebre, disnea, y pleuritis. Aquellos que también desarrollan la infección respiratoria de *Pasteurella* tiende a ser mayor y crónica la enfermedad del tracto respiratorio bajo, y la ruta de infección parece ser la inhalación. El organismo también puede ser oportuno y afecta a los pacientes

immunocomprometidos, causando neumonía en los pacientes con SIDA y deficiencia de inmunoglobulina A. Es mucho menos frecuente, que *Pasteurella* cause osteomielitis, infecciones intra-abdominales, artritis séptica, sepsis, y meningitis (Chen *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Diferentes especies de *Pasteurella*, su hospedador, las enfermedades que ocasiona y localización anatómica de donde se ha aislado (Gutiérrez *et al.*, 2002).

Espece (s)	Hospedador (s)	Enfermedad o localización anatómica
<i>P. multocida</i>		
Tipo A	Bovino	Fiebre de embarque, neumonía enzoótica en terneros, mastitis en ocasiones.
	Ovino	Pleuroneumonía y mastitis
	Porcino	Neumonía, por lo general, secundaria.
	Conejos	Pleuroneumonía, abscesos, otitis media, conjuntivitis, infecciones genitales.
	Aves	Cólera aviar.
	Otros animales	Neumonía y otros procesos en animales estresados. Comensales de los aparatos digestivos y respiratorios.
Tipo B	Rumiantes y cerdos	Septicemia hemorrágica.
Tipo D	Cerdos	Rinitis Atrófica (con o sin <i>Bordetella bronchiseptica</i>)
	Cerdos y aves	Neumonía (generalmente secundaria).
Tipo E	Rumiantes	Septicemia Hemorrágica en África.
Tipo F	Pavos	No es claro su papel en la enfermedad.
<i>P. pneumotropica</i>	Roedores	Neumonía secundaria y abscesos tras mordeduras. Comensal en nasofaringe.
	Perros y gatos	Comensal en nasofaringe
<i>P. canis</i>	Perros	Aislado de la cavidad oral y de mordeduras en seres humanos.
<i>P. dagmatis</i>	Perros y gatos	Cavidad oral e intestino de perros y gatos. Aislado de mordeduras producidas por perros en seres humanos

Cuadro 1. (Continuación) Diferentes especies de *Pasteurella*, su hospedador, las enfermedades que ocasiona y localización anatómica de donde se ha aislado (Gutierrez *et al.*, 2002).

Especie (s)	Hospedador (s)	Enfermedad o localización anatómica
<i>P. stomatis</i>	Perros y gatos	Aparato respiratorio. No suele ser patógeno.
<i>P. caballi</i>	Equino	Infecciones respiratorias y neumonía.
<i>P. aerogenes</i>	Porcino	Comensal en el intestino, aborto en seres humanos, cerdos y otros mamíferos. Abscesos en seres humanos tras mordedura.
<i>P. anatis</i>	Patos	Aislado del intestino. Sin demostrar su carácter patógeno.
<i>P. gallinarum</i>	Aves	Comensal de la mucosa respiratoria. Patógeno excepcionalmente.
<i>P. avium</i> , <i>P. langaaensis</i> y <i>P. volantium</i> .	Pollos	Aislada del aparato respiratorio sin demostrar su carácter patógeno.
<i>P. testudinis</i>	Tortugas	Abscesos. Seguramente oportunista.
<i>P. bettyae</i>	Seres humanos	Abscesos en glándulas de Bartholini.
<i>P. limphangitidis</i>	Rumiantes asiáticos	Linfangitis.
<i>P. marii</i>	Porcino	Abortos. Septicemia en lechones.
<i>P. trealosi</i>	Ovinos	Septicemia en corderos viejos.

Cuadro 2. Diferentes especies de *Mannheimia*, su hospedador, las enfermedades que ocasiona y localización anatómica de donde se ha aislado (Gutierrez *et al.*, 2002).

Espece (s)	Hospedador (s)	Enfermedad o localización anatómica
<i>M. haemolytica</i>	Bovino y ovino	Neumonías. Forma parte del complejo de la fiebre de embarque en bovinos y ovinos. Septicemias y mastitis en ovejas.
<i>M. granulomatis</i>	Bovino	Paniculitis fibrogranulomatosas. Aislada igualmente de la cavidad oral
<i>M. varigena</i>	Ovino y porcino	Septicemia y neumonía también descritas cepas no patógenas.
<i>M. glucosita</i>	Bovino	Porción superior del aparato respiratorio.
<i>M. ruminalis</i>	Bovino	Comensal del rumen.
<i>Riemerella anatipestifer</i>	Patos y otras aves	Poliserositis fibrinosa en animales de entre 1 – 8 semanas

2.3. Signos y lesiones.

Debido a la asociación íntima de la mucosa respiratoria a las sustancias medioambientales, 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 (Fales-Williams *et al.*, 2002).

Un concepto de etiología multifactorial para la fiebre de embarque se acepta ampliamente en círculos científicos que implican que junto con otras condiciones de estrés favorecen las infecciones virales del tracto respiratorio que se complican con *Pasteurella* y otras infecciones bacterianas, llevando a menudo a una neumonía fatal. Los agentes bacterianos en la fiebre de

embarque son *M. haemolytica* o *P. multocida* así como las infecciones por *Haemophilus somnus* (Storz *et al.*, 2000).

El proceso es una septicemia aguda y se caracteriza clínicamente por la aparición repentina de fiebre (41–42 °C), salivación profusa, petequias en submucosa, abatimiento grave, y muerte en unas 24 horas. La bacteria se puede localizar en tejido subcutáneo, provocando zonas de tumefacción caliente y dolorosa alrededor del cuello, papada, pecho, y región perineal, así como una disnea grave si se obstruyen las vías respiratorias. En las últimas etapas del brote, algunos de los animales afectados muestran signos de alteración pulmonar o digestiva (Radostits *et al.*, 2002).

La fiebre de embarque ocurre frecuentemente en el ganado después del transporte (Storz *et al.*, 2000). Se caracteriza clínicamente por una bronconeumonía aguda que cursa con toxemia y anatomopatológicamente por una neumonía lobular exudativa, distribuida anteroventralmente, en la que predomina la fibrina en el exudado y acompañada frecuentemente por una pleuritis fibrinosa (Radostits *et al.*, 2002; Petras *et al.*, 1995).

2.4. Diagnóstico.

El diagnóstico clínico se realiza por aislamiento e identificación del agente causal. Las bacterias se pueden aislar en sangre o en un hisopo de frotis nasal realizado en un animal que lleve muerto pocas horas. La sangre o el hisopo nasal no son fiables durante la fase clínica de la enfermedad ya que la septicemia se produce al final. En los animales que llevan más tiempo muertos se realizan cultivos de la médula ósea de los huesos largos (Radostits *et al.*, 2002). El diagnóstico definitivo se hace por identificación de laboratorio presentando el agente causal (Townsend *et al.*, 1998).

La precisa detección de 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 demostrar cierta dificultad durante los

estudios de campo, cuando se toman las muestras de nariz y garganta del animal portador en un sitio contaminado (Townsend *et al.*, 1998).

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas de identificación que permite la 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
Glucosa.	Positiva	Positiva
Hemólisis	Positivo	Negativo
Crecimiento en Agar Mac ConKey	Positiva	Negativo
Reducción de Nitratos	Positivo.	Positivo.
Indol.	Negativo.	Positivo.
Urea.	Negativo.	Negativo.

2.5. Métodos de tipificación para *P. multocida* y *M. haemolytica*.

2.5.1. 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 *P. 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)

2.5.2. Serotipificación.

Se han usado varios métodos para la serotipificación de *P. 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 *P. 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).

Para la serotipificación de *M. haemolytica* se tiene que eliminar la capsula mediante un tratamiento con ácidos o hialuronidasa y se pueden distinguir hasta 16 antígenos somáticos (1 al 16). Las serovariedades se denominan mediante una combinación de ambos antígenos (A1). La letra representa el tipo capsular y el número se alude al tipo somático. Así, cada aislamiento se designa por una combinación de su biotipo y su serotipo. (Fodor *et al.*, 1996).

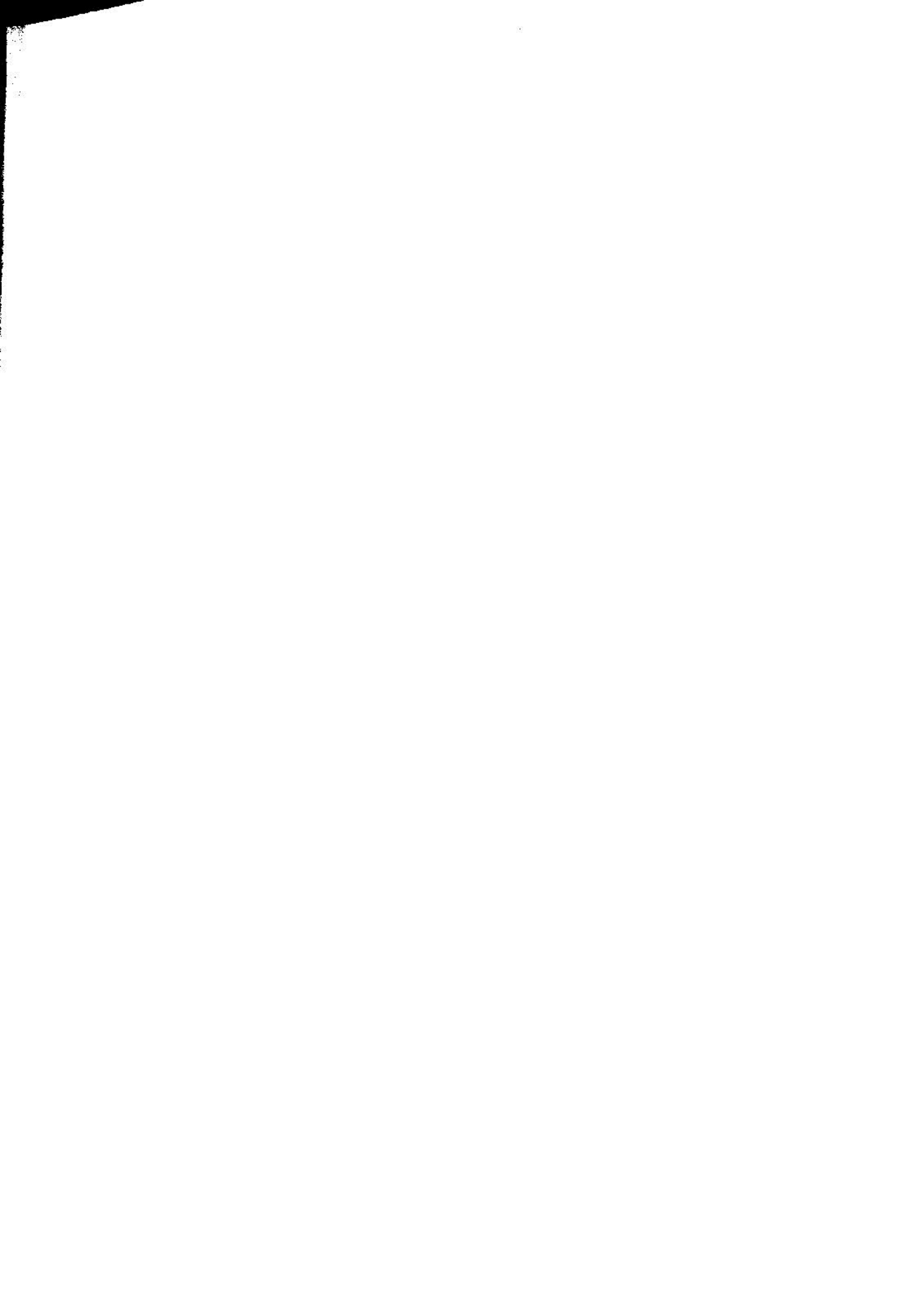
2.5.3. Genotipificación.

La Genotipificación esta basada en la caracterización de ADN del organismo por el análisis del ADN cromosomático o los plásmidos de ADN. Los métodos que han sido aplicados para la identificación cromosomática de *P. multocida* y *M. haemolytica* incluyen el análisis de endonucleasas de restricción, ribotipificación y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Pachificus, 2000)

2.6. Patogenia y determinantes de la virulencia de *P. multocida* y *M. haemolytica*.

2.6.1. Patogenia.

En bovinos clínicamente normales, existe un número reducido de *M. haemolytica* en amígdalas y vías nasales. La exposición de los bovinos sanos a factores de estrés tales como una infección vírica, cambios de manejo y



cambios ambientales, estimulan un crecimiento explosivo y la colonización selectiva de *M. haemolytica*. En condiciones normales, los macrófagos alveolares eliminan de forma eficaz a *M. haemolytica* de los alvéolos mediante mecanismos de fagocitosis (Radostit *et al.*, 2002).

Cuando un número elevado de bacterias entran y colonizan el pulmón interactúan con los macrófagos alveolares y con las citocinas las cuales actúan como factores quimiotácticos que inducen la llegada de neutrófilos en el sitio de la inflamación debido a su habilidad para inducir directamente la quimiotaxis e inducir indirectamente la producción de lípidos quimiotácticos (Yoo *et al.*, 1995). La adherencia de leucocitos circulantes en el endotelio microvascular es importante para se circule 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). Hay evidencias que sugieren que IL-8 es la citosina quimiotáctica más poderosa hacia los neutrófilos, más que otras citocinas, ya que promueven el reclutamiento y activación de neutrófilos en los espacios alveolares (Yoo *et al.*, 1995).

2.6.2. Determinantes de la virulencia.

2.6.2.1. La cápsula.

Algunas bacterias están rodeadas por una sustancia que forma una cubierta o envoltura alrededor de la célula. Cuando el material está dispuesto de un modo compacto alrededor de la superficie celular se denomina cápsula, ésta generalmente está compuesta de polisacáridos, polipéptidos o complejos de polisacáridos y proteínas. La cápsula también impide la fijación de los bacteriófagos a la célula bacteriana y dificulta el paso de los antimicrobianos al interior de ésta (Vadillo *et al.*, 2002).

M. haemolytica produce un polisacárido capsular extracelular (CPS). Se ha documentado el papel del CPS en la virulencia de varios patógenos gram negativos. Algunas de sus actividades incluyen la adhesión, prevención de la

deseccación y resistencia del hospedero a la defensa inmune. Se ha informado que el CPS es importante en la adhesión de la bacteria a las superficies alveolares y la inhibición del complemento esta mediada por la eliminación de suero así como la inhibición de los fagocitos y las actividades bactericida de los neutrófilos (Lo *et al.*, 2001).

Recientemente era poco conocida la composición del material capsular de los serogrupos de *P. multocida*. Estudios de resonancia magnéticos nucleares confirmaron que el mayor componente del polisacárido de la cápsula era el ácido hialurónico (Townsend *et al.*, 2001).

2.6.2.2. Fimbrias.

Las fimbrias son de naturaleza proteica, la capacidad de poseerlas es hereditaria, favorecen la adherencia de la bacteria a diversos tejidos del hospedador y por lo tanto son elemento que participan en la la iniciación de la infección (Vadillo *et al.*, 2002).

La presencia de fimbrias se ha observado en cepas de *P. multocida*. Recientemente, se identificaron dos tipos de fimbrias en los serogrupos de cepas del tipo D; el primer tipo era similar al tipo 1 y el segundo era morfológicamente similar a *Escherichia coli*. Se ha concluido que esta adherencia puede ser debida a las fimbrias en lugar del material capsular y esas fimbrias son las estructuras de superficie principalmente involucradas en la adherencia (Ruffolo *et al.*, 1997).

2.6.2.3. Lipopolisacaridos.

Se ha identificado lipopolisacaridos asociados a proteínas (LAP), como un componente de las endotoxinas, en la patogenia, de pasteurellosis neumónica (Brogden *et al.*, 1995). Los lipopolisacaridos (LPS) representan 10 a 25% del peso total de *M. haemolytica*, y es un factor de virulencia importante. Los LPS son los responsable para la inducción de IL-1beta e IL-8 vía TNF-alfa,

iniciando la entrada de neutrófilos y la inflamación, los LPS dañan las células del endotelio pulmonar bovino (Malazdrewich *et al.*, 2001). Se ha propuesto que los LPS de *M. haemolytica* pueden causar hipersensibilidad inmunomediada que puede exacerbar inflamación y daño localizado en el pulmón. Lafleur, *et al.*, han mostrado que el LPS refuerza la actividad citolítica de la leucotoxina y este LPS refuerza la IL8 leucotoxina-dependiente y la expresión del TNF-alfa en los macrófagos alveolares bovinos. Se han informado ocho tipos de LPS diferentes en *M. haemolytica* serotype A1 (Highlander, 2001).

2.6.2.4. Leucotoxina.

La leucotoxina se considera el factor de virulencia primario de *M. haemolytica* pero está claro que hay otros factores potenciales involucrados en su patogenia, el lipopolisacarido, el polisacárido, la cápsula, la fimbrias, la glicoproteasa, la neuraminidasa, el antígeno específico para el serotipo, y las proteínas de la membrana externa (Fedorova *et al.*, 1997).

M. haemolytica secreta una leucotoxina que es letal para los leucocitos de rumiantes (Petras *et al.*, 1995). La leucotoxina también es producida por cepas de *M. glucosida* y *P. trehalosi*. (Davies *et al.*, 2002). La leucotoxina es un factor de virulencia importante en la patogenia de la pasteurelosis. Esta citotoxina se ha implicado en el deterioro del organismo en la respuesta a la infección eliminando las células de defensa, interfiriendo con sus funciones. El papel específico de la leucotoxina en la patogenia e infección de *P. 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 *M. haemolytica* en la fiebre de embarque es complicada por la presencia de varios factores de virulencia (Petras *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 2001).

La quimiotaxis de los neutrófilos y su incapacidad para combatir la infección puede ser debida a la formación de poros por la leucotoxina, esta

citotoxina que producen las bacterias causa lisis de los leucocitos rumiantes y plaquetas y la exposición de neutrofilos bovinos en bajas concentraciones a la misma estimula la descarga de eicosanoides quimiotácticos, como leucotrienos B4 (Wang *et al.*, 1998).

La leucotoxina se codifica en un operon compuesto de cuatro genes, *lktA*, *lktB*, *lktC*, y *lktD*. El gen estructural *lktA* requiere el producto de *lktC* para la activación; los genes restantes, el *lktB* y *lktD*, codifican proteínas que están envueltas en la secreción de la toxina (Murphy *et al.*, 1995; Uhlich *et al.*, 1999, Highlander *et al.*, 1997). Se ha propuesto que los cuatro genes adyacentes al otro clúster del gen (*lktCABD*) permiten sugerir que la leucotoxina de *M. haemolytica* es capaz de lisar los eritrocitos ovinos (Murphy *et al.*, 1995).

El Hierro es un nutriente íntegro para la supervivencia de casi todos los organismos y es un cofactor esencial de numerosos procesos metabólicos y enzimáticos. Por consiguiente, investigadores creen que las proteínas que se expresaron bajo condiciones limitadas de hierro pueden ser esenciales para la supervivencia bacteriana y pueden servir finalmente como los blancos terapéuticos. El hierro es abundante en el ambiente y no debe ser un factor limitante para el crecimiento. Sin embargo, bajo las condiciones aeróbicas y pH neutro o el alcalino, el hierro se precipita como un hidróxido de Fe³ insoluble. De esta manera resulta vital que los sistemas biológicos mantengan el hierro. En respuesta al problema de escasez férrica, los patógenos extracelulares Gram-negativos de la familia Pasteurellaceae y familia de Neisseriaceae han desarrollado una afinidad alta para los sistemas de adquisición férricos con el fin de obtener este nutriente esencial (Shouldice *et al.*, 2003).

La Patogenicidad de *M. haemolytica* es marcada por la replicación rápida, la inhalación subsecuente del organismo en los pulmones, y la expresión de la leucotoxina. Durante el estado de enfermedad, *M. haemolytica* experimenta cambios dramáticos en su ambiente físico. Al inicio de la enfermedad, *M. haemolytica* 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 experimentan 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 *M. haemolytica* pueden ser una señal para modular la expresión de la leucotoxina (Marciel and Highlander, 2001).

2.6.2.5. Neuraminidasa.

La neuraminidasa se produce por una variedad de bacterias además de *M. haemolytica* y *P. multocida* (White *et al.*, 1995). La neuraminidasa producida por *M. haemolytica*, juega un papel en la colonización. En otros patógenos respiratorios bacterianos, se piensa que la neuraminidasa deslisa las glicoproteínas salivales, permitiendo que los organismos patógenos puedan escapar a las defensas en la orofaringe. Para *M. haemolytica*, es probable que la actividad de la neuraminidasa facilite la colonización de la superficie de la mucosa, particularmente en el tracto respiratorio superior. Straus, *et al.* han mostrado que todos los serotipos de *M. haemolytica* producen neuraminidasa y que las enzimas asociadas son de 150 a 200 kD (Highlander, 2001).

Scharmman *et al.*, demostraron que 102 de 104 cepas de *P. multocida* producen neuraminidasa. Drzeniek *et al.* Demostraron que casi todas las cepas de *P. multocida* que ellos examinaron tuvieron producción de esta enzima (White *et al.*, 1995).

2.6.2.6. Sialidasa.

La sialidasa es una enzima que degrada el ácido siálico de las glicoproteínas, 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*, *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 "pequeña", mientras que la sialidasa *V. cholerae* es mayor a 80 kDa. Hay ambigüedades en la literatura con respecto al tamaño de la sialidasa de *P. multocida*. Drzeniek *et al.* aisló una enzima de 250 kDa. Sin embargo, Ifeanyi y Bailie aislaron una de 36 kDa proteína que poseyó la actividad de la sialidasa. Estos informes hacen pensar en la posibilidad de combinaciones en cuanto a tamaño de la sialidasa en cepas de *P. multocida* (Mizan *et al.*, 2000).

2.7. Resistencia antimicrobiana.

El término de resistencia antimicrobiana se aplica para calificar el hecho de que el crecimiento de una población bacteriana no se inhibe ante la presencia de dicho antimicrobiano (Blanco *et al.*, 2002).

Un gran problema que enfrenta el veterinario ante el complejo respiratorio bovino, es qué tipo de antibiótico usar y en qué dosis será efectivo, ya que desde hace más de 20 años se informó del aislamiento de cepas de *Pasteurella spp* que mostraban resistencia a uno o más antibióticos, llegando en la actualidad al grado que la resistencia mostrada por estos agentes a distintos antimicrobianos ha alcanzado niveles preocupantes (Pijoan *et al.*, 2000).

Entre los antibióticos que presentan mayor resistencia se encuentran las tetraciclinas. La primera resistencia a este antibiótico se descubrió en 1993 en un gen de hibridación del plásmido pVM111 (Hansen *et al.*, 1993). Después, estos genes también se descubrieron en porcinos en aislamientos de *P. multocida* y de *M. haemolytica* en bovinos (Kehrenberg *et al.*, 1998; Kehrenberg *et al.*, 2003).

La danofloxacin es una fluoroquinolona con rápida actividad bactericida en contra de una extensa gama de patógenos responsables de un gran número de síndromes y enfermedades de importancia económica en la crianza comercial de ganado. Desde su introducción a finales de 1980, se ha

demostrado por numerosos estudios que la actividad bactericida de las fluoroquinolonas depende de la exposición a una cierta concentración, por lo cual el efecto óptimo se logra por la administración de dosis altas durante un periodo corto (Sarasola *et al.*, 2002).

Se han propuesto nuevos antibióticos para el tratamiento de neumonías tales como la tilmicosina, esto debido a su farmacodinamia en los tejidos apropiados y sus bajas concentraciones de inhibición. Un reciente estudio sugiere que la tilmicosina reduce la inflamación pulmonar en becerras con neumonía. Los estudios anteriores han indicado que algunos macrólidos pueden tener las propiedades antiinflamatorias reduciendo la acumulación de células inflamatorias como PMNs, leucocitos mononucleares, y linfocitos (Chin *et al.*, 2000).

Por el contrario Pijoan *et al.* destacan la alta incidencia encontrada en un estudio de cepas de *Pasteurella spp.*, así como de *H. somnus* resistentes a la tilmicosina, lo cual contrasta con lo descrito previamente por otros autores que han indicado su alta eficacia contra estos agentes, ya sea "in vitro" como "in vivo", indicando la posibilidad de lograr un tratamiento efectivo de la neumonía en bovinos con tan sólo una inyección de este antibiótico del grupo de los macrólidos. Contrario a lo anterior, es de interés precisar que aquellos antibióticos poco utilizados en veterinaria (como es la mezlocilina) o de reciente introducción en la región (como las cefalosporinas) si muestran una alta efectividad "in vitro" contra los agentes estudiados (Pijoan *et al.*, 2000).

2.8. Vacunas.

Los estudios de *M. haemolytica* han identificado varios factores potenciales que pueden contribuir con la virulencia y qué podrían usarse para controlar la infección (Mahasreshti *et al.*, 1997). Estos factores incluyen la leucotoxina, el polisacárido capsular, las proteínas de la membrana externa, fimbrias y neuraminidasa. La meta de varias investigaciones en esta área es determinar cual de estos factores de virulencia son los mejores para generar el desarrollo de nuevas vacunas. Un acercamiento complementario a estudios de

Cuadro 4. Porcentaje de resistencia, sensibilidad media y sensibilidad alta de *Pasteurella multocida* a diversos antibióticos (Pijoan et al., 2000)

Antibiótico	Resistentes	Sensibilidad media	Sensibilidad alta
CFL	0	18.2	81.8
ET	0	45.5	51.5
CTX	3	0	97
GT	3	33.3	63.6
MEZ	9.1	6.1	84.8
S-T	12.1	15.2	72.7
AML	15.2	12.1	72.7
CXC	18.2	39.4	42.4
TC	18.2	72.7	9.1
FLOR	23.5	58.8	17.7
AMP	28.5	57.2	14
PEN	42.8	57.2	0
TIL	42.8	57.2	0
OT	63.6	18.2	18.2
STR	66.7	30.3	3
K	93.9	0	6.1
LINC	97	3	0

Claves: AML= Amoxicilina. AMP= Ampicilina. CFL= Cefalexina. CTX= Cefotaxima. CXC= Cloxacilina. ET= Eritromicina. FLOR=Florfenicol. GT= Gentamicina. K= Kanamicina. LINC= Lincomicina. MEZ= Mezlomicilina. OT= Oxitetraciclina. PEN= Penicilina. S-T= Sulfametoxazol-trimetoprim. STR= Estreptomina. TC= Tetraciclina. TIL= Tilmicocina

la inmunización que han tenido el éxito estudiando la virulencia de numerosos patógenos es la construcción de cepas mutantes deficientes en uno o mas factores de virulencia. Con esta perspectiva, se han aislado y caracterizado

dos cepas mutantes de *M. haemolytica* que no producen la leucotoxina (Chidambaram *et al.*, 1995).

Cuadro 5. Porcentaje de resistencia, sensibilidad media y sensibilidad alta de *Mannheimia haemolytica* a diversos antibióticos (Pijoan *et al.*, 2000).

Antibiótico	Resistentes	Sensibilidad media	Sensibilidad alta
CTX	0	0	100
CFL	6.5	25.8	67.7
MEZ	12.9	22.6	67.7
GT	12.9	58.1	22.6
ET	16.12	51.6	29.0
TC	19.4	77.4	3.2
TIL	21.4	78.5	0
S-T	25.8	9.7	64.5
FLOR	26.3	52.6	21.1
AML	35.5	12.9	51.6
CXC	38.7	41.9	19.4
OT	41.9	58.1	0
AMP	78.5	21.4	0
STR	83.9	16.1	0
PEN	85.7	14.2	0
K	100	0	0
LINC	100	0	0

Claves: AML= Amoxicilina. AMP= Ampicilina. CFL= Cefalexina. CTX= Cefotaxima. CXC= Cloxacilina. ET= Eritromicina. FLOR=Florfenicol. GT= Gentamicina. K= Kanamicina. LINC= Lincomicina. MEZ= Mezlocilina. OT= Oxitetraciclina. PEN= Penicilina. S-T= Sulfametoxazol-trimetoprim. STR= Estreptomina. TC= Tetraciclina. TIL= Tilmicocina

Se ha descrito que hay genes que codifican a la proteína de la membrana externa (rP1pE) y que al adicionarlo a una vacuna comercial que contenga fragmentos de *M. haemolytica* da mejores resultados para reaccionar como un inmunógeno en el ganado, se han utilizado para la vacunación del ganado 100 mg de rP1pE, esto reforzó la resistencia al desafío experimental con *M. haemolytica* (Pandher *et al.*, 1998; Ayalew *et al.*, 2004).

3. Justificación.

El complejo respiratorio bovino, de origen multifactorial, incluye infecciones bacterianas las cuales generalmente son secundarias y producen neumonías y frecuentemente la muerte de los animales (Juarez, 2001; Callan, 2002). Los agentes etiológicos involucrados en las neumonías pueden ser virus, bacterias, micoplasmas, además de sinergismos virus-bacteria (Juarez, 2001; Callan, 2002; Morales, 1993). Dentro de los agentes bacterianos involucrados con mas frecuencia se encuentran *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus sommnus*, así como micoplasmas (Juarez, 2001; Callan, 2002; Morales, 1993; Trigo 1991). Las enfermedades respiratorias en bovinos son una importante causa de pérdidas económicas a nivel nacional y sin embargo, hay pocos estudios que indiquen la situación actual de la frecuencia de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*; de acuerdo a estos datos, se consideró necesario realizar un estudio en la Comarca Lagunera, ya que representa un importante centro de producción de leche bovina a nivel nacional.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo General.

Determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* o ambas en bovinos Holstein clínicamente sanos de neumonía en establos de la Comarca lagunera.

4.2. Objetivos Específicos.

4.2.1. Identificar aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* o ambas a partir de hisopos nasales obtenidos de bovinos Holstein clínicamente sanos de neumonía en establos de la Comarca Lagunera.

4.2.2. Determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* o ambas a partir de hisopos nasales obtenidos de bovinos Holstein clínicamente sanos de neumonía en establos de la Comarca Lagunera.

5. Marco de referencia.

La Comarca Lagunera, región ubicada en el centro-norte de México, está conformada por parte de los Estados de Coahuila y Durango y debe su nombre a los cuerpos de agua que se formaban alimentados por dos ríos: el San Juan y el Aguanaval, hasta antes de la construcción de las presas Lázaro Cárdenas y Francisco Zarco, que en la actualidad regulan su afluente.



Figura 1. Localización de la Comarca Lagunera.

La Laguna, como comúnmente es conocida esta próspera región, está regada por 16 municipios, 11 del Estado de Durango y 5 del Estado de Coahuila.

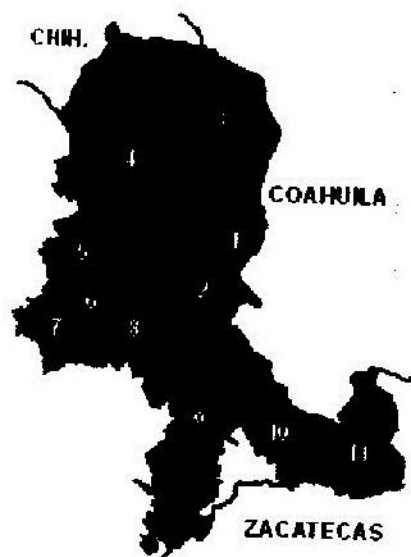


Figura 2. Comarca Lagunera de Durango.

- 1.- Gómez Palacio, 2.- Lerdo, 3.- Tlahualilo de Zaragoza, 4.- Mapimí, 5.- San Pedro del Gallo, 6.- San Luis Cordero, 7.- Rodeo, 8.- Nazas, 9.- Cuencamé de Ceniceros, 10.- General Simón Bolívar, 11.- San Juan de Guadalupe.



Figura 3. Comarca Lagunera de Coahuila.

- 1.- Torreón, 2.- Matamoros, 3.- San Pedro de las Colonias, 4.- Francisco I. Madero, 5.- Viesca.

Material y métodos.

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo y transversal. La fase de campo se llevó a cabo en la Comarca Lagunera, la cual cuenta con 320 unidades productivas (UP) con una población aproximada de 1000 bovinos por P. Esta fase se efectuó de octubre de 2004 a marzo del 2005. La fase de laboratorio se trabajó en el la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la UAAAN, UL. El muestreo se llevó a cabo en una aleatoria en 20 hatos tomándose el 2% del total de cada hato. Se muestrearon bovinos Holstein que no presentaron evidencias clínicas de neumonías. Se obtuvieron muestras de mucosa nasal mediante hisopos estériles, las cuales se sembraron en agar sangre e identificaron con tinción de

Gram y pruebas bioquímicas. El análisis de los resultados se realizó mediante estadística descriptiva, a través de frecuencias en relación a edad, sexo y localización.

7. Resultados.

Se muestrearon 20 unidades productivas, con una población total de 36850 animales. Se obtuvo un total de 737 muestras de hisopos nasales. 497 correspondieron a bovinos Holstein clínicamente sanos menores de un 1 año de edad y 240 a bovinos Holstein clínicamente sanos mayores de 1 año de edad. Se encontró un total de 137 aislamientos (18.6%). Se obtuvieron 46 aislamientos de *Mannheimia haemolytica* (6.2%), 65 aislamientos de *Pasteurella multocida* (8.8%) y 26 aislamientos de ambas (3.5%). De los 240 animales mayores de 1 año, se obtuvieron 12 aislamientos de *Mannheimia haemolytica* (5%), 4 de *Pasteurella multocida* (1.67%) y 1 de ambas (.42%) para dar un total de 17 aislamientos (7.08%). De los 497 bovinos holstein clínicamente sanos menores de 1 año se obtuvieron 27 aislamiento de *Mannheimia haemolytica* (5.43%), 69 de *Pasteurella multocida* (13.88%) y 24 de ambas (4.83%) dando un total de 120 aislamientos (24.14%)

Cuadro 6. Relación de establos muestreados en la Comarca Lagunera para el aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente sanos.

Nº UP	< 1 año	> 1 año	Total Animales	Población Total
1	61	27	88	4400
2	7	3	10	500
3	15	6	21	1050
4	83	37	120	6000
5	40	17	57	2850
6	31	13	44	2200
7	28	12	40	2000
8	28	12	40	2000
9	14	6	20	1000
10	36	14	50	2500
11	15	8	23	1150
12	14	6	20	1000
13	13	6	19	950
14	12	28	40	2000
15	39	17	56	2800
16	7	3	10	500
17	16	8	24	1200
18	21	9	30	1500
19	7	3	10	500
20	10	5	15	750
Total	497	240	737	36850

UP = Unidad de Producción.

Cuadro 7. Aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente sanos.

N° UP	Total de n	Aislamientos							
		Mh	%	Pm	%	Pm/Mh	%	Total	%
1	88	9	10.2	1	1.1	2	2.3	12	13.6
2	10	0	0.0	2	20.0	0	0.0	2	20.0
3	21	1	4.8	11	52.4	0	0.0	12	57.1
4	120	3	2.5	1	0.8	0	0.0	4	3.3
5	57	1	1.8	15	26.3	9	15.8	25	43.9
6	44	2	4.5	0	0.0	0	0.0	2	4.5
7	40	1	2.5	3	7.5	3	7.5	7	17.5
8	40	0	0.0	4	10.0	0	0.0	4	10.0
9	20	0	0.0	2	10.0	0	0.0	2	10.0
10	50	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
11	23	0	0.0	4	17.4	0	0.0	4	17.4
12	20	1	5.0	0	0.0	4	20.0	5	25.0
13	19	1	5.3	8	42.1	1	5.3	10	52.6
14	40	4	10.0	0	0.0	1	2.5	5	12.5
15	56	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
16	10	0	0.0	6	60.0	0	0.0	6	60.0
17	24	0	0.0	7	29.2	0	0.0	7	29.2
18	30	10	33.3	1	3.3	6	20.0	17	56.7
19	10	6	60.0	0	0.0	0	0.0	6	60.0
20	15	7	46.7	0	0.0	0	0.0	7	46.7
Total.	737	46	6.2	65	8.8	26	3.5	137	18.6

UP = Unidad de Producción.

n = Número de animales muestreados por UP.

Mh = *Mannheimia haemolytica*.

Pm = *Pasteurella multocida*.

Cuadro 8. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente sanos mayores de un año.

Nº UP	Total de n	Aislamientos							
		Mh	%	Pm	%	Mh/Pm	%	Total	%
1	27	3	11.11	2	7.41	0	0	5	18.52
2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6	0	0	0	0	0	0	0	0
4	37	0	0	0	0	0	0	0	0
5	17	1	5.88	1	5.88	1	5.88	3	17.65
6	13	0	0	0	0	0	0	0	0
7	12	0	0	0	0	0	0	0	0
8	12	0	0	0	0	0	0	0	0
9	6	0	0	0	0	0	0	0	0
10	14	0	0	0	0	0	0	0	0
11	8	0	0	1	12.5	0	0	1	12.50
12	6	0	0	0	0	0	0	0	0
13	6	1	16.67	0	0	0	0	1	16.67
14	28	0	0	0	0	0	0	0	0
15	17	0	0	0	0	0	0	0	0
16	3	0	0	0	0	0	0	0	0
17	8	0	0	0	0	0	0	0	0
18	9	3	33.33	0	0	0	0	3	33.33
19	3	2	66.67	0	0	0	0	2	66.67
20	5	2	40	0	0	0	0	2	40
Total	240	12	5	4	1.67	1	0.42	17	7.08

UP = Unidad de Producción.

n = Número de animales muestreados por UP.

Mh = *Mannheimia haemolytica*.

Pm = *Pasteurella multocida*.

Cuadro 9. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente sanos menores de un año.

N° UP	Total de n	Aislamientos						Total	%
		Mh	%	Pm	%	Mh/Pm	%		
1	61	3	4.92	3	4.92	1	1.64	7	11.48
2	7	0	0	2	28.57	0	0	2	28.57
3	15	1	6.67	11	73.33	0	0	12	80
4	83	3	3.61	1	1.20	0	0	4	4.82
5	40	0	0.00	14	35.00	8	20.00	22	55.00
6	31	2	6.45	0	0	0	0	2	6.45
7	28	1	3.57	3	10.71	3	0	7	14.29
8	28	0	0	4	0	0	0	4	0
9	14	0	0	2	14.29	0	0	2	14.29
10	36	0	0	0	0	0	0	0	0
11	15	0	0	3	20	0	0	3	20.00
12	14	1	7.14	0	0	4	28.57	5	35.71
13	13	0	0.00	8	61.54	1	7.69	9	69.23
14	12	0	0	4	33.33	1	8.33	5	41.67
15	39	0	0	0	0	0	0	0	0
16	7	0	0	6	85.71	0	0	6	85.71
17	16	0	0	7	43.75	0	0	7	43.75
18	21	7	33.33	1	4.76	6	28.57	14	66.67
19	7	4	57.14	0	0	0	0	4	57.14
20	10	5	50	0	0	0	0	5	50
Total	497	27	5.43	69	13.88	24	4.83	120	24.14

UP = Unidad de Producción.

n = Número de animales muestreados por UP.

Mh = *Mannheimia haemolytica*.

Pm = *Pasteurella multocida*.

8. Discusión.

De acuerdo a un estudio realizado por Blanco *et al.*, en los rastros de Ferrería de la Ciudad de México y Tlanepantla Estado de México, a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos, de 232 lesiones neumónicas, 42 correspondieron a *Mannheimia haemolytica* y 75 a *Pasteurella multocida* (Blanco *et al.*, 1993).

Por otra parte, Zanabria *et al.*, en un estudio llevado a cabo a partir de pulmones neumónicos, para determinar la etiología del síndrome neumónico agudo en ganado de engorda, en Lima, Peru, del 55% de los casos (n=11) se aislaron microorganismos del género *Pasteurella*. De estos, el 73% (n=8) correspondieron a *P. multocida* y el restante (n=3) a *M. haemolytica*. Cuando se utilizaron exudados nasales como fuente de recuperación bacteriana, los aislamientos bacterianos se elevaron a 70% (n=14) y con predominancia de *P. multocida* (n=9) y los 5 restantes a *M. haemolytica* (Zanabria *et al.*, 2000).

Pijoan *et al.*, encontraron en becerras lecheras en establos de Tijuana y Rosarito, Baja California, 34 cepas de *P. multocida*, 31 de *M. haemolytica* y 11 de *H. somnus*, aislados de pulmones neumónicos, en una total de 100 becerras (Pijoan *et al.*, 2000).

De acuerdo a estos antecedentes, se observa que los aislamiento bacterianos a partir de pulmones neumónicos o hisopos nasales, corresponden más a *P. multocida* que a *M. haemolytica*. A pesar de que no se encontraron estudios similares al presente trabajo en el país y en el resto del mundo, nuestros resultados coinciden con los anteriores, ya que en becerras Holstein de la Comarca Lagunera se obtuvieron aislamientos de *P. multocida* en un 8.8 % y de *M. haemolytica* en un 6.2 % y aislamientos mixtos, de ambas bacterias, en un 3.5 %.

9. Conclusiones.

- Es más frecuente encontrar *Pasteurella multocida* que *Mannheimia haemolytica* en bovinos holstein clínicamente sanos de neumonía en La Comarca Lagunera.
- Es conveniente considerar la posibilidad de encontrar una asociación entre *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos holstein clínicamente sanos de neumonía en La Comarca Lagunera.
- La probabilidad de encontrar *Mannheimia haemolytica* o *Pasteurella multocida* o ambas es mayor en bovinos Holstein clínicamente sanos menores de un año que en los mayores de un año.
- La probabilidad de encontrar *Mannheimia haemolytica* es mayor que a la de *Pasteurella multocida* en bovinos holstein clínicamente sanos mayores de un año.

10. Literatura citada.

1. **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.
2. **Argueta, J.** (1988). Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. *Rev. Vet. Mex.* 9: 93-97.
3. **Ayalew S., Confer, A., and Blackwood, E.** (2004). Characterization of immunodominant and potentially protective epitopes of *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane lipoprotein PlpE. *Infect Immun.* 72(12): 7265-74.
4. **Blanco, M.T, Morán, F.J., Pérez, C.** (2002). Resistencia bacteriana. Valoración de antimicrobianos. Manual de Bacteriología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. Primera Edición.
5. **Blanco, V.F.J., Trigo, T.F.J., 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. *Rev. Vet. Mex.* 24(2): 107-112.
6. **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.
7. **Callan, R.** (2002). Biosecurity and bovine respiratory disease. *Vet Clin Food Anim.* (18): 57-77.
8. **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.
9. **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.

10. **Chin, A.C., Lee, W.D., Murrin, K.A. and Morck, D.W.** (2000). Tilmicosin induces apoptosis in bovine peripheral neutrophils in the presence or in the absence of *Pasteurella haemolytica* and promotes neutrophil phagocytosis by macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(9): 2465-2470.
11. **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.
12. **Davies, R., Arkinsaw S., and Selander, R.** (1997). Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep. *Infect Immun.* 65(9): 3585-3593.
13. **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.
14. **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.
15. **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.
16. **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.
17. **Fodor, L., Péntzes, Z. and Varga, J.** (1996). Coagglutination test for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol.* 34(2): 393-397.
18. **González, R. C.** (2002). Perfil serológico contra antígenos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en corderos clínicamente enfermos de neumonía y desafiados experimentalmente. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

19. **Gutiérrez, P.J.A., Aguilar, R.F., Suárez, G.F., Hernández, C.R.,** (2003). Bacilos Gram Negativos Asociados al Aparato Respiratorio. Manual de Practicas de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias. UNAM
20. **Gutiérrez, B.C., De La Puente, A.V., Rodríguez, F.F.** (2002). Géneros *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Mannheimia*. Manual de Bacteriología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. Primera Edición.
21. **Hansen, L.M., Blanchard, P.C, and Hirsh, D.C.** (1996). Distribution of tet(H) among *Pasteurella* isolates from the United States and Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1558–1560.
22. **Highlander, S.K.** (2001). Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci.* 6(11): 28-50.
23. **Highlander, S.K. and Hang V.T.** (1997). A putative leucine zipper activator of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin transcription and the potential for modulation of its synthesis by slipped-strand mispairing. *Infect Immun.* 65(9): 3970-3975.
24. **Jawetz, E.** (1990). Microbiología Médica. 13a edición. El Manual Moderno. México, D.F.
25. **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.
26. **Kehrenberg, C., Werckenthin, C. and Schwarz, S.** (1998). Tn5706, a transposon-like element from *Pasteurella multocida* mediating tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(8): 2116-2118.
27. **Kehrenberg, C., Nga Thi Thu Tham, and Schwarz, S.** (2003). New plasmid-borne antibiotic resistance gene cluster in *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(9): 2978-2980.
28. **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.

29. **Kuhnert, P., Korczak, B., Falsen, E., Straub, R., Hoops, A, Boerlin, P., Frey J., 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
30. **Lo, R.Y.** (2001). Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* A1". *Vet Microbiol*. 83: 23-35.
31. **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. *Infect Immun*. 69(7): 4458-4464.
32. **Mahasreshti P., Murphy G., Wyckoff J., Farmer S., Hancock R. and Confer A.** (1997). Purification and partial characterization of the OmpA family of proteins of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun* 65(1): 211-218.
33. **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.
34. **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. *Infect Immun*. 69(10): 6231-6239.
35. **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.
36. **Morales, J.** (1993). Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Rev. Vet. Mex.* 24(2): 97-105.
37. **Murphy, G.L., Whitworth, L.C., Clinkenbeard, K.D., and Clinkenbeard, P.A.** (1995). Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun*. 63(8): 3209-3212.
38. **Narayanan, S.** (2002). Leukotoxins of gram-negative bacteria *Vet Microbiol*. 84:337-356.
39. **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.

40. **Pandher, K., Confer, A. and Murphy, G.** (1998). Genetic and immunologic analyses of PipE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Infect Immun.* 66(12): 5613-5619.
41. **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. *Infect Immun.* 63(3): 1033-1039.
42. **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.
43. **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. *Rev. Vet. Méx.* 31(2): 153-156
44. **Radi, Z., Register K., Lee, K., Kehrl, 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.
45. **Radostits, O. M., Gay, C.C, Blood, D.C., and Hinchcliff, K.W.** (2000). A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses, 9th ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
46. **Ruffolo, C.G., Tennent, J.M., Michalski, W.P. and Adler, B.** (1997). Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun.* 65(1): 339-343.
47. **Sarasola, P., Lees, P., AliAbadi, F.S., McKellar, Q.A., Donachie, W., Marr, K. A., Sunderland, S.J. and Rowan, T.G.** (2002). Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of danofloxacin administered by two dosing regimens in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(9): 3013-3019.

48. **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación** (2003). Resumen Nacional de la Producción Pecuaria. Avance Mensual 2002. Servicio de Información Estadística, Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA.
URL: <<http://www.sagarpa.gob.mx/sagar3.htm>>.
49. **Shouldice, S., Dougan, D., Williams, P., Skene, R., Snell, G., Scheibe, D., Kirby, S., Hosfield, D., McRee, D., Schryvers, A. and Tari, L.** (2003). Crystal structure of *Pasteurella haemolytica* ferric ion-binding protein A reveals a novel class of bacterial iron-binding proteins. *J Biol Chem.* 278(42): 41093-41098.
50. **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.
51. **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.
52. **Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., and Adler, B.** (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol.* 39(3): 924-929.
53. **Trigo, T.F.** (1987). El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cien Vet.* 4: 1-36.
54. **Trigo, T.F.** (1991). Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelisis pulmonar bovina. *Rev. Vet. Mex.* 22(2): 31-134.
55. **Uhlich, G., McNamara, P., Landolo, J. and Mosler D.** (1999). Cloning and characterization of the gene encoding *Pasteurella haemolytica* FnrP, a regulator of the *Escherichia coli* silent hemolysin sheA. *J Bacteriol.* 181(12): 3845-3848.
56. **Vadillo, S., Jiménez, R., Plriz, S.** (2002). Estructura y función de la célula bacteriana. Manual de Bacteriología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. Primera Edición.

57. **Wang, Z., Clarke, C., and Clinkenbeard, K.** (1998). *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. *Infect Immun.* 66(5): 1885-1890.
58. **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.
59. **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. *Infect Immun.* 63(2): 381-388.
60. **Sanabria, V., Rivera, G.H., Rosadio, A.R.** (2000). Etiología del Síndrome Neumónico Agudo en Vacunos de Engorde en Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 11(2):169-187.

11. Anexos.

Anexo 1. Cuestionario para la toma de muestras en los diferentes establos.

1. No. Registro:
2. Fecha y hora del muestreo:
3. Nombre y número de establo:
4. Datos del animal:
 - 4.1. Edad:
 - 4.2. Sexo (M) (H)
 - 4.3. Procedencia (Local) (Traslado)
5. Alojamiento:
 - 5.1. (1. Dentro de naves) (2. Corraletas al aire libre) (3. En corral)
 - 5.2. Su área de recría es: (1. Establo) (2. Corral de área de recría)
(3. Nave de área de recría)
6. Suministro de calostro:
 - 6.1. (SI) (NO)
 - 6.2. A partir de cuantas horas de nacido: (0. Después de la primera hora)
(1. A la primera hora) (2. No se sabe).
7. Vacunación:
 - 7.1. (0. SI) (1. NO) (2. No se sabe)
 - 7.2. Contra que enfermedades

IBR	(Si) (No) (No sabe)	Brucelosis	(Si) (No) (No sabe)
DVB	(Si) (No) (No sabe)	Leptospirosis	(Si) (No) (No sabe)
Parainfluenza 3	(Si) (No) (No sabe)	Pasteurellosis	(Si) (No) (No sabe)
VRSB	(Si) (No) (No sabe)		
8. Movilización:
 - 8.1. (0. Sin movilización) (1. Con movilización)
 - 8.2. Cuando fue la última movilización
9. Antibioterapia:
 - 9.1. (0. SI) (1. NO)
 - 9.2. Que medicamentos
 - 9.3.Cuál fue la causa

INSTRUCCIONES DE LLENADO DEL CUESTIONARIO

1. Número de Registro: Es el número de cuestionario. Debe corresponder en el orden en que se tomaron las muestras de los animales.
2. Fecha y hora del muestreo: Anotar la hora, el día, el mes y el año exacto en que se tomaron las muestras de cada uno de los animales.
3. Nombre y número de establo: Anotar el nombre y número de establo donde se tomaron las muestras.
4. Datos del animal:
 - 4.1. Edad. Anotar la edad exacta del animal (día, mes y año).
 - 4.2. Sexo. Identificar si es macho o hembra el animal muestreado.
 - 4.3. Procedencia. Se debe anotar la procedencia del animal.
5. Alojamiento: Se tomará como becerro a todo animal que esté dentro del rango de 0 a 14 meses de edad.
 - 5.1. Anotar si el becerro se encuentra dentro de naves, en becerreras o si se encuentra en corrales junto a parideros.
 - 5.2. Anotar si el becerro se encuentra dentro de naves, en becerreras o si se encuentra en corrales junto a parideros.
6. Suministro de calostro: Anotar si se le dio o no suministro de calostro al animal, si la respuesta es afirmativa, a partir de cuantas horas de nacido se le dio el calostro.
7. Vacunación: Anotar si el animal ha sido vacunado y contra que enfermedades han sido vacunados (IBR, DVB, PI3, VSRB, Brucelosis, Leptospirosis, Pasteurelisis).
8. Movilización: Anotar si el animal ha sido movilizado o no y cuando fue la última movilización (día, mes y año).
9. Antibioterapia: Anotar si el animal ha recibido tratamiento médico. ¿cuál fue la causa?. Anotar la enfermedad y al signología que motivo el tratamiento.

Anexo II. Técnicas de siembras en medios de cultivo utilizadas para la identificación de posibles colonias de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

Figura 4. Picadura con asa recta.

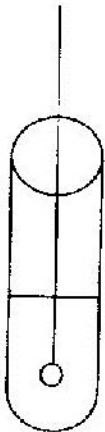
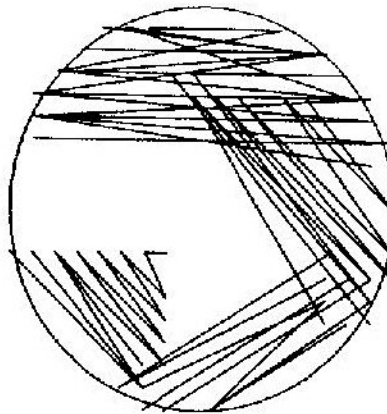


Figura 5. Siembra para aislamiento en cultivo.



- Depositar el inóculo en el cuadrante 1 únicamente.
- Flamear y enfriar el asa entre cuadrante.
- Asegurar que exista contacto entre las estrias de cada cuadrante (1 con 2, 2 con 3 y 3 con 4).

Figura 6. Siembra por picadura en el fondo del tubo y en estria sobre la superficie.

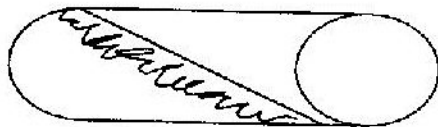
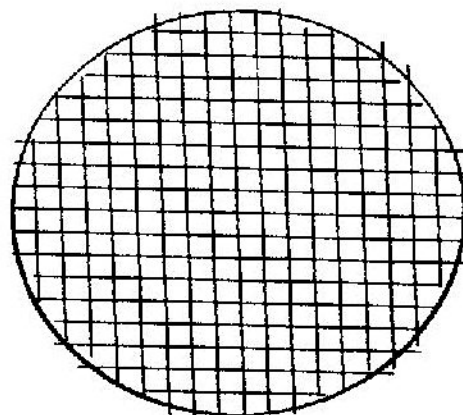


Figura 7. Siembra en estria.



Anexo III: Técnica para la realización de frotis.

La técnica para realizar un frotis bacteriano es variable dependiendo si el cultivo se encuentra en un medio sólido o líquido.

Material

- Laminillas de cristal
- Lápiz graso
- Asa microbiológica
- Mechero Bunsen

Procedimiento

- Utilice laminillas limpias y marcadas para su identificación. Con un lápiz graso marque el área donde se va a colocar la muestra.
- En la laminilla se coloca una gota de agua destilada y con un asa microbiológica se toma una pequeña cantidad de cultivo que se va a teñir y se mezcla bien.
- Extienda la gota sobre la laminilla formando una capa fina. Debe evitarse preparar un frotis demasiado grueso.
- Deje secar las laminillas a temperatura ambiente.
- Cuando se haya secado el frotis pase 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.

Anexo IV. Tinción de Gram; modificación de Reed.

La tinción de Gram es aplicada en forma Universal como primer paso en la identificación de las bacterias y levaduras. Este método divide a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo a los componentes predominantes de su pared celular y permite, así mismo, la observación microscópica de la morfología (cocos, bacilos), el tamaño y la agrupación que suele presentar (cadenas, racimos). En el caso de las levaduras, por las características de su pared celular, se tiñe como Gram positivas (Escalante C., *et al* 2003).

PROCEDIMIENTO

- Agregar violeta de genciana por un minuto.
- Enjuagar con abundante agua.
- Aplicar lugol por un minuto.
- Enjuagar con abundante agua.
- Agregar alcohol acetona durante 15 segundos.
- Enjuagar con abundante agua.
- Colocar safranina durante un minuto.
- Enjuagar con suficiente agua.

Por lo tanto los microorganismos que conserven el color cristal violeta se observan de azul o morado (Gram positivos) y los que no lo hacen mostrarán un color rosa o rojo que corresponde a la safranina (Gram negativos).

Anexo IV. Tinción de Gram; modificación de Reed.

La tinción de Gram es aplicada en forma *Universal como primer paso* en la identificación de las bacterias y levaduras. Este método divide a las bacterias en dos grupos: *Gram positivas* y *Gram negativas*, de acuerdo a los componentes predominantes de su pared celular y permite, así mismo, la observación microscópica de la morfología (cocos, bacilos), el tamaño y la agrupación que suele presentar (cadenas, racimos). En el caso de las levaduras, por las características de su pared celular, se tiñe como Gram positivas (Escalante C., et al 2003).

PROCEDIMIENTO

- Agregar violeta de genciana por un minuto.
- Enjuagar con abundante agua.
- Aplicar lugol por un minuto.
- Enjuagar con abundante agua.
- Agregar alcohol acetona durante 15 segundos.
- Enjuagar con abundante agua.
- Colocar safranina durante un minuto.
- Enjuagar con suficiente agua.

Por lo tanto los microorganismos que conserven el color cristal violeta se observan de azul o morado (Gram positivos) y los que no lo hacen mostrarán un color rosa o rojo que corresponde a la safranina (Gram negativos).

Anexo V. Procedimiento para la preparación de agar sangre para medio de cultivo.

Material

- Matraz con capacidad de 1 litro.
- Báscula.
- Mecheros Bunsen.
- Autoclave.
- Guantes.
- Cajas petri.
- Sangre de bovino sano.

Procedimiento

- Para un litro de agar se requiere 40 g de agar (tripticosa soya agar), se vierte en el matraz y se mezcla homogéneamente; posteriormente se coloca al calor hasta hervir.
- Se cubre el matraz y posteriormente se esteriliza a 15 libras durante 15 minutos.
- Después de esterilizado el agar se procede a agregarle sangre estéril de bovino (30ml) y mover hasta que se integre al agar.
- Servir el agar en cajas petri y dejar secar.
- Posteriormente colocarlas en la estufa a 39° C para verificar que no estén contaminadas.

Anexo VI. Procedimiento para la preparación de pruebas bioquímicas.

OXIDASA (METODO 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 es determinar la producción de la enzima citocromo oxidasa (indofenol oxidasa).

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

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

Interpretación de Resultados.

Utilizando un asa de platino o un asa de vidrio tomar colonias del microorganismo a probar.

Frotar las colonias sobre las superficies de papel filtro.

La aparición de un color púrpura intenso indica una prueba positiva. Reacciones tardías deben ser ignoradas, una prueba negativa estará indicada por cualquier otro color o ausencia del color.

CITRATO DE SIMONS. 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 azul.

El método de siembra es por estria. incubándose a 37 °C durante 24 a 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 de SIM, al cual después del desarrollo bacteriano, se le agrega el reactivo de Kovac's (150 ml de alcohol isomilico, amilico o butilico 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 Kovac's detecta estos anillos indólicos libres y por lo tanto, indirectamente la producción de la enzima triptofanasa por parte de la bacteria.

Método de siembra, incubación e interpretación.

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

2. Agregar 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. Determina la capacidad para utilizar azúcares, producción de ácidos sulfhídricos y producción de gas por fermentación.

Medios y reactivos. El medio de TSI no 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.

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.

Método de siembra.

- Se realiza por picadura en el 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.
- El periodo de incubación es de 18 a 24 horas como máximo. El prolongar la incubación puede dar lugar a lectura falsa, ya que algunas reacciones pueden revertirse.
- Cuando no existe un buen crecimiento tanto en el fondo como en la superficie de los resultados debe tomarse como reserva.

UREA. Se aplica 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.

Objetivo. Determina la habilidad de las bacterias de producir enzimas ureasa que desdobra la urea en amoníaco.

Medios y reactivos. El método que se utiliza en agar es un medios sólido con base peptonada, glucosa y minerales, conteniendo 2 % de 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 pH.

El periodo de incubación es por 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.

Anexo VII.



Figura 8. Colonias de *Pasteurella multocida*.

- Textura firme
- Consolidación craneoventral
- Exudado purulento en bronquios

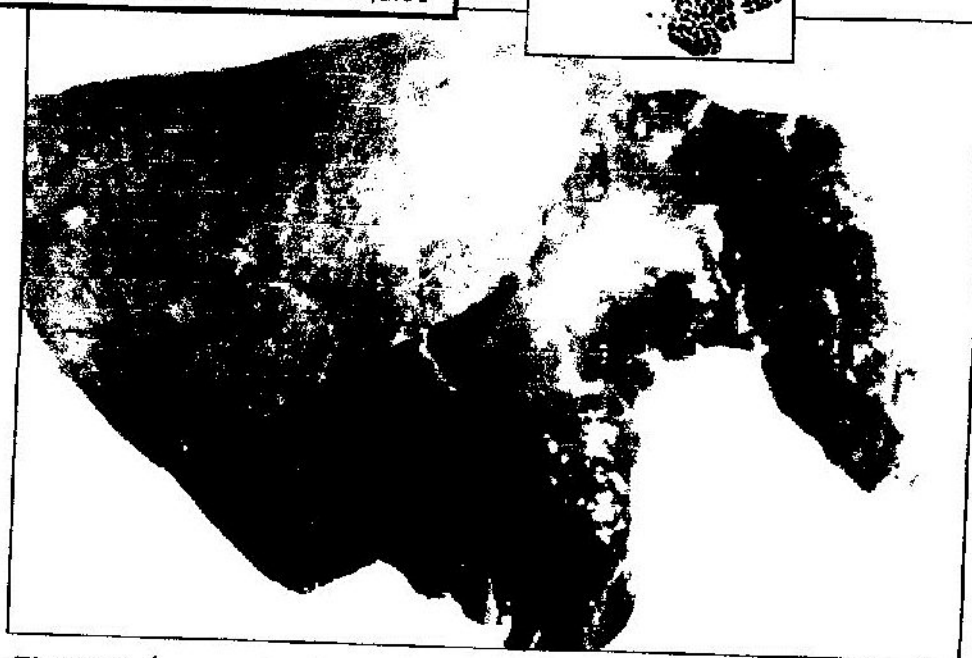


Figura 9. Áreas rojas de consolidación y atelectasia con localización anteroventral por *Pasteurella multocida*.



Figura 10. Exudado purulento en bronquios por *Pasteurella multocida*.

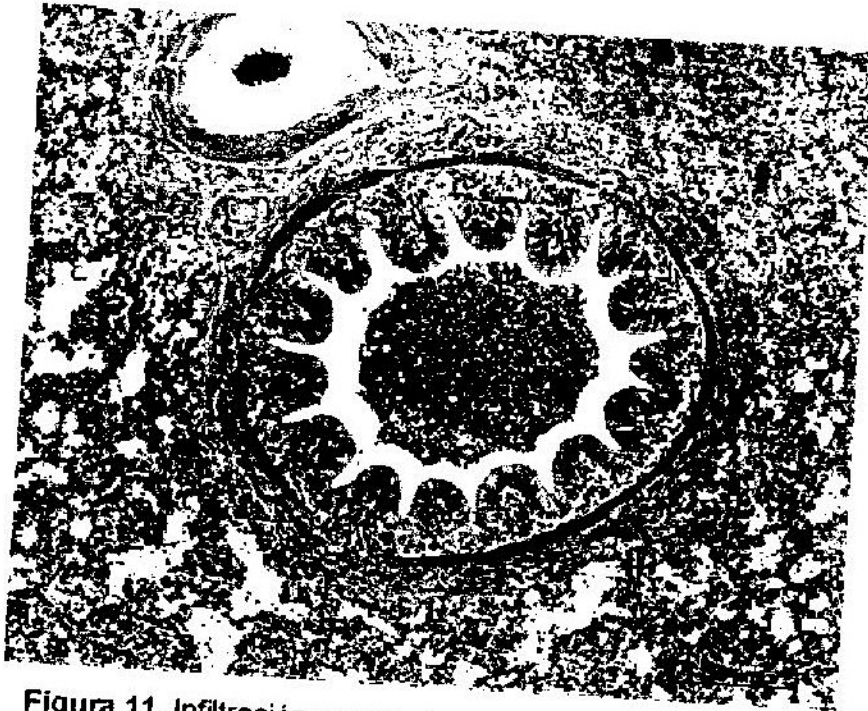


Figura 11. Infiltración severa de neutrófilos en bronquiolos por *Pasteurella multocida*.

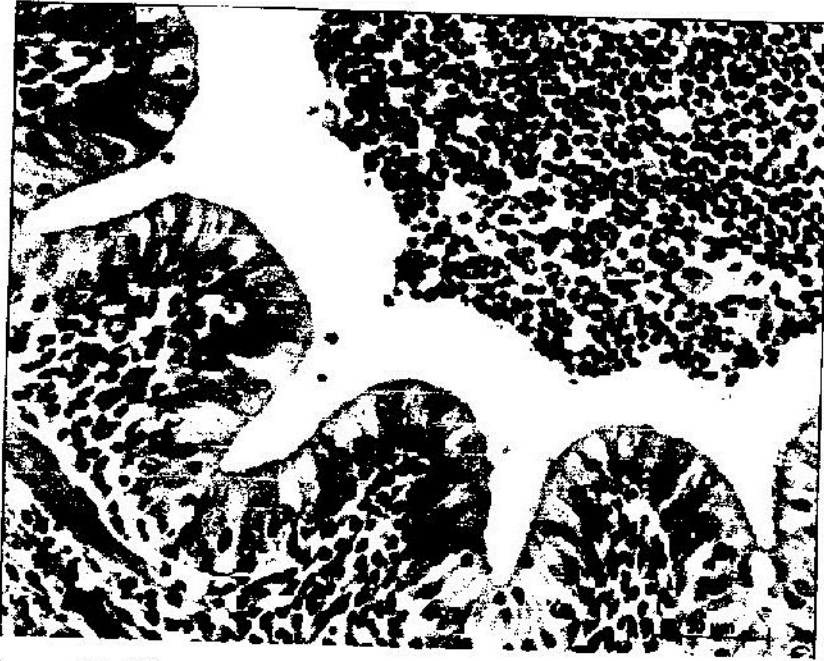


Figura 12. Migración de neutrófilos del epitelio cilíndrico ciliado a hacia la luz del bronquiolo.

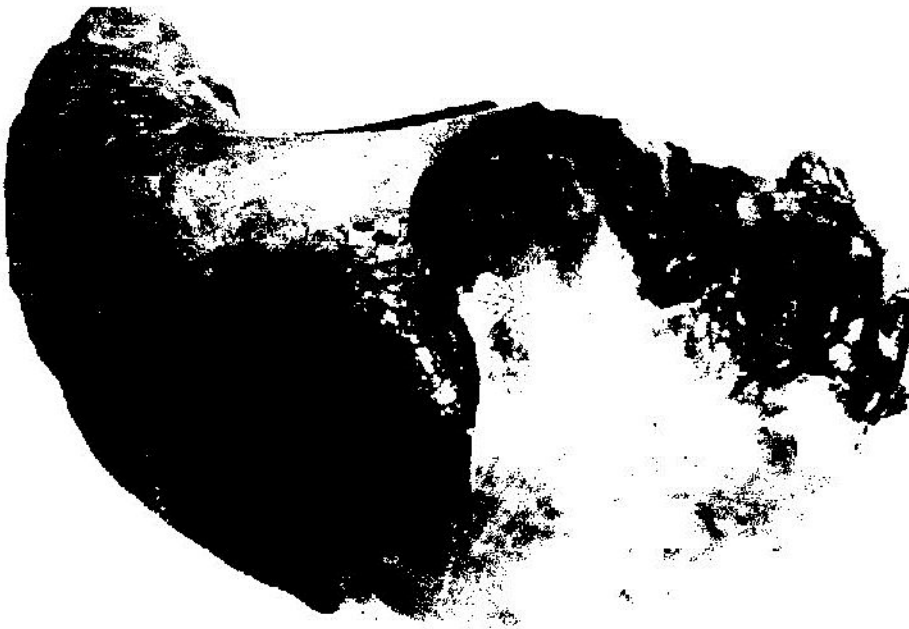


Figura 13. Bronconeumonía fibrinosa causada por *Mannheimia haemolytica*.



Figura 14. Aspecto del corte en un pulmón con bronconeumonía fibrinosa. Nótese las áreas de marmoleo.

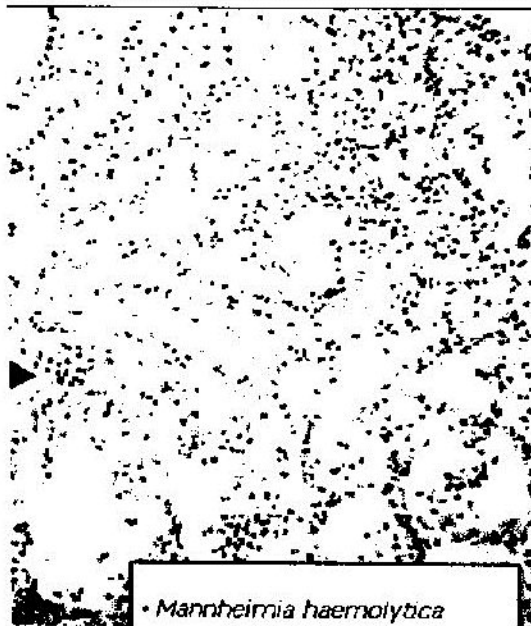


Figura 15. Aspecto microscópico de un pulmón con bronconeumonía fibrinosa por *Mannheimia haemolytica*.