

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

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



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

POR:

YARA IVETTE CRUZ MÉNDEZ

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
ENFERMOS DE NEUMONÍA EN LA COMARCA LAGUNERA,
DURANTE LA TEMPORADA OTOÑO - INVIERNO".

POR:

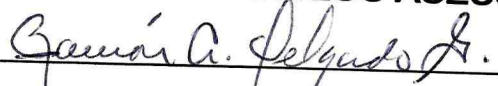
YARA IVETTE CRUZ MÉNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR LOS ASESORES


M.C. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ.


M.C. CARLOS J. JARAMILLO ARANGO.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

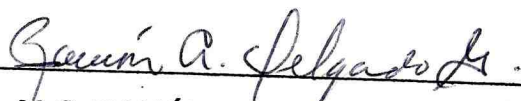
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

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

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

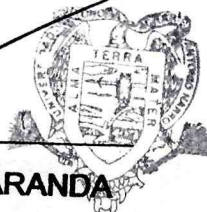
PRESIDENTE DEL JURADO



M.C. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ.

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UU

“FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Mannheimia haemolytica* Y *Pasteurella multocida* EN BOVINOS HOLSTEIN CLÍNICAMENTE ENFERMOS DE NEUMONÍA EN LA COMARCA LAGUNERA, DURANTE LA TEMPORADA OTOÑO – INVIERNO”.

**TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE
ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO**

DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


PRESIDENTE:


M.C. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ.

VOCAL:


M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA.

VOCAL:


M.C. CARLOS J. JARAMILLO ARANGO.

VOCAL SUPLENTE:


M.V.Z RODRIGO I. SIMÓN ALONSO.

I. Dedicatorias

A MIS PADRES:

Con mucho amor, respeto y admiración:

CARMEN MÉNDEZ HERNÁNDEZ Y FELIPE CRUZ RAMIREZ

A los seres que me dieron la vida, con mucho cariño y amor, sabiendo que no existirá una forma de agradecer toda una vida de sacrificios y esfuerzos, por la infinita paciencia y confianza que me brindaron siempre. También les doy gracias por permitirme culminar, una de mis más grandes metas, formarme como profesionista, que es para mí la mejor de las herencias. Por haber inculcado en mí, el camino correcto de la vida por su amistad, apoyo, y todos sus consejos para llegar a ser alguien, Que fácil es todo cuando hay apoyo, sin ustedes no sería lo que soy, no estaría donde estoy.

A MIS HERMANOS:

LUIS Y MARITZA

Con quienes he compartido a lo largo de mi vida, momentos maravillosos gracias por apoyarme y animarme a seguir adelante los quiero mucho.

A DIOS

Por haberme prestado vida, salud y la fuerza necesaria para mantenerme firme en la más grande de mis metas y culminar mi carrera profesional como Médico Veterinario Zootecnista.

A LA UAAAN-UL

Por haberme brindado la oportunidad de estar en sus instalaciones y así formarme como profesional.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Gracias por brindarme algunos momentos de su vida y compartir momentos de alegría y tristeza juntos, esperando algún día nos volvamos a encontrar.

II. Agradecimientos

Este proyecto fué financiado por la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", con clave de registro ante la dirección de docencia 0203 1402 2766 y por CONACYT con número G-38590-B, a cargo del Dr. Francisco J. Trigo Tavera, investigador Nacional de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

M.C. CARLOS J. JARAMILLO ARANGO: Por habernos brindado la oportunidad de trabajar con usted, y asesorarnos durante el desarrollo del trabajo.

Dr. FRANCISCO AGUILAR ROMERO Quien fué parte importante del proceso y trabajo de las muestras.

M.C. RAMÓN A. DELGADO GONZALEZ: Por su valiosa cooperación, sugerencias y orientación en el asesoramiento durante la realización del presente trabajo, por su amistad, confianza y apoyo muchas gracias.

COECYT: Por la beca otorgada durante la elaboración del presente trabajo.

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 enfermos de neumonía en establos de La Comarca Lagunera.

El estudio realizado fue de tipo descriptivo, prospectivo y transversal. El muestreo se llevó a cabo en octubre del 2004 a marzo del 2005 en forma no aleatoria ya que fue por criterio en 20 hatos tomándose el 100% de los animales enfermos que presentaron evidencias clínicas de neumonía, lo cual fue equivalente a 111 animales muestreados, divididos en animales menores de un año 73 muestras y mayores de un año 38 muestras. Se obtuvieron muestras de exudado nasal mediante hisopos estériles con un medio de transporte de *Stuart*, las cuales se transportaron en refrigeración hasta el lugar de trabajo, se sembraron en agar sangre y se identificaron con tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

Los resultados obtenidos de los estudios microbiológicos realizados fueron el aislamiento de *Pasteurella multocida* en 26 casos (23.4%) seguido de *Mannheimia haemolytica* en 11 casos (9.9%), y ambas bacterias (*Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*) en 7 casos (6.3%); obteniendo un total de 44 muestras positivas (39.6%) a partir de hisopos nasales. De acuerdo a estos resultados, es más frecuente encontrar *Pasteurella multocida* que *Mannheimia haemolytica* en bovinos holstein clínicamente enfermos de neumonía en La Comarca Lagunera. Es conveniente considerar la posibilidad de encontrar una asociación entre ambas.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
I. Dedicatorias.	i
II. Agradecimientos.	ii
III. Resumen.	iii
1. Introducción.	1
2. Revisión de la literatura.	3
2.1. Taxonomía de <i>Pasteurella</i> y <i>Mannheimia</i> .	3
2.2. Mecanismos de defensa del aparato respiratorio.	9
2.2.1. Mecanismos inespecíficos.	9
2.2.2. Mecanismos específicos (inmunitarios).	9
2.3. Epidemiología.	9
2.4. Patogenia de <i>Pasteurella</i> y <i>Mannheimia</i> .	10
2.4.1. Factores de virulencia.	11
2.4.1.1. Leucotoxina.	11
2.4.1.2. Lipopolisacárido.	12
2.4.1.3. Proteínas de membrana externa.	13
2.4.1.4. Fimbrias.	13
2.4.1.5. Cápsula.	13
2.4.1.6. Neuraminidasa.	14
2.4.1.7. Sialidasa.	15
2.5. Manifestaciones clínicas.	15
2.6. Lesiones.	16
2.7. Diagnóstico.	18
2.7.1. Aislamiento bacteriológico e identificación.	18
2.7.2. Análisis histopatológico.	20
2.7.3. Otros métodos empleados para identificación de <i>P. multocida</i> y <i>M. haemolytica</i> .	21
2.8. Tratamiento.	21

2.9. Resistencia a antimicrobianos.	23
2.10. Prevención.	25
3. Justificación.	25
4. Objetivos.	26
4.1. Objetivo General.	26
4.2. Objetivos Específicos.	26
5. Marco de referencia.	26
6. Material y métodos.	28
7. Resultados.	28
8. Discusión.	31
9. Conclusiones.	32
10. Literatura citada.	33
11. Anexos.	39
Anexo 1. Cuestionario para la toma de muestras en los diferentes establos.	39
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> .	41
Anexo III: Técnica para la realización de frotis.	42
Anexo IV. Tinción de Gram; modificación de Reed.	43
Anexo V. Procedimiento para la preparación de agar sangre para medio de cultivo.	44
Anexo VI. Procedimiento para la preparación de pruebas bioquímicas.	45

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Especies del género <i>Pasteurella</i> , sus hospedadores y las enfermedades que se encuentran asociadas.	7
Cuadro 2. Especies del género <i>Mannheimia</i> , sus hospedadores y las enfermedades que se encuentran asociadas.	8
Cuadro 3. Diferenciación entre los géneros <i>Pasteurella</i> y <i>Mannheimia</i> .	19
Cuadro 4. Antibióticos empleados para el tratamiento y prevención de la pasterelosis bovina.	22
Cuadro 5. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Mannheimia haemolytica</i> a antibióticos.	24
Cuadro 6. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Pasteurella multocida</i> a antibióticos.	25
Cuadro 7. Relación de establos muestreados en la Comarca Lagunera para aislamientos de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en animales clínicamente enfermos.	29
Cuadro 8. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en animales clínicamente enfermos.	30
Cuadro 9. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en animales clínicamente enfermos menores de un año.	30
Cuadro 10. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en animales clínicamente enfermos mayores de un año.	30

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. El pulmón afectado esta consolidado, tiene una apariencia lobulillar acentuada y el color varía de rojo intenso en casos agudos (hiperemia) a gris en casos crónicos (inflamación, atelectasia, fibrosis) por <i>P. multocida</i> .	17
Figura 2. Los bronquios contienen exudado purulento el cual es fácilmente visible al comprimir el parénquima pulmonar. En los casos más crónicos, el exudado se vuelve más mucoide debido a la hiperplasia de células caliciformes (<i>P. multocida</i>).	17
Figura 3. Presencia de fibrina sobre las superficies pleurales por <i>M. haemolytica</i> .	17
Figura 4. Depósitos de fibrina en pulmón por <i>M. haemolytica</i> .	17
Figura 5. Identificación de colonias de <i>P. multocida</i> y <i>M. haemolytica</i> .	19
Figura 6. Gran número de neutrófilos en los espacios bronco alveolares (forma aguda) por <i>P. multocida</i> .	20
Figura 7. Pérdida total de los espacios aéreos debido a una exudación exuberante de fibrina, neutrófilos hacia el lumen de los bronquios, bronquiolos y alvéolos por <i>M. haemolytica</i> .	20
Figura 8. Localización de la Comarca Lagunera.	27
Figura 9. Comarca Lagunera de Durango.	27
Figura 10. Comarca Lagunera de Coahuila.	27
Figura 11. Picadura con asa recta.	41
Figura 12. Siembra para aislamiento en cultivo.	41
Figura 13. Siembra por picadura en el fondo del tubo y en estría sobre la Superficie.	41
Figura 14. Siembra en estría.	41

1. Introducción.

La producción bovina se ve afectada en su eficiencia y eficacia productiva por diversos factores, entre los cuales se encuentran las enfermedades infecciosas y de ellas los problemas respiratorios representan 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, aunque la mortalidad es menor al 5 %. Las enfermedades ocurren frecuentemente en becerras de uno a cinco meses de edad, con una incidencia mayor en animales nacidos durante el otoño y el invierno (Pijoan *et al.*, 1999).

Las enfermedades respiratorias de los bovinos se han estudiado como entidades independientes, sin embargo se sabe que en la presentación de estas enfermedades conjugan una serie de factores y agentes patógenos, por lo que se llama complejo respiratorio bovino (CRB). El CRB constituye una de las principales causas de pérdidas económicas, tan sólo en Estados Unidos de América se han estimado pérdidas anuales por 640 millones de dólares. Este complejo respiratorio se caracteriza clínicamente por fiebre, disnea, descarga nasal y evidencia de neumonía mediante auscultación pulmonar (Juárez *et al.*, 2003).

Los microorganismos responsables del CRB son virus, bacterias y su interacción virus-bacteria (Juárez *et al.*, 2003). Entre los agentes virales involucrados se encuentran: Herpesvirus bovino 1 responsable de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), virus de *parainfluenza tipo 3* (VPI3) y virus respiratorio sincicial bovino (VRSB) (Storz *et al.*, 2000).

Las infecciones bacterianas generalmente son secundarias y producen neumonías de bovinos, ovinos, cabras y otras especies. Dentro de los agentes bacterianos involucrados con mas frecuencia se encuentran *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus sommnus*, así como micoplasmas (Carter *et al.*, 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).

Hay pocos estudios que indiquen la situación actual de la frecuencia de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* a nivel nacional; 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 y por lo tanto, el objetivo de la investigación fue determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente enfermos de neumonía en La Comarca Lagunera.

2. Revisión de la literatura.

2.1. Taxonomía de *Pasteurella* y *Mannheimia*.

La familia *Pasteurellaceae* ha estado integrada tradicionalmente por los géneros *Pasteurella*, *Actinobacillus*, y *Haemophilus* (Biberstein, 1990).

Normalmente se aíslan bacterias que pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* de diferentes tipos de animales y la mayoría se considera como comensales o patógenos oportunistas. Han sido añadidos dentro de la familia *Pasteurellaceae* nueve géneros diferentes (*Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Lonepinella*, *Phocoenobacter*, *Histophilus*, *Gallibacterium*, y *Volucribacter*) (Kuhnert et al., 2004).

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* subsp *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. caballii*, y *P. granulomatis*; y en 1990, *P. bettyea*, *P. lymphangitidis*, *P.mairii* y *P. trehalosi* (Gutiérrez et al., 2002).

En 1921, Jones informó tres grupos de *Pasteurella* en bovinos y las cepas atípicas fueron puestas en el grupo de "*Bacillus bovissepticus*", Estas cepas se caracterizaron después por Newsom & Cross (1932), quién propuso el nombre *Pasteurella haemolytica* para este grupo (Angen et al., 1999).

La *P. haemolytica* primitiva descrita por Smith (1959, 1961) se dividió en dos biovariedades A y T, atendiendo a la capacidad de fermentar arabinosa y trealosa respectivamente. Utilizando un sistema de serotipificación basado en una

prueba de hemaglutinación indirecta (HI), se describieron un total de 17 serovariedades (Blackalla *et al.*, 2002).

Sin embargo, los biotipos A y T no sólo diferían bioquímicamente, también serológicamente desde los serotipos, asociados solamente con el biotipo A, A1, A2, A5 hasta A9 y de A11 hasta A14, A16 y A17 (Davies *et al.*, 1996), mientras que los serotipos T3, T4, T10, y T15 se asociaban con el biotipo T. Además de las diferencias bioquímicas, serológicas, epidemiológicas y patogénicas, había diferencias entre los biotipos A y T, y se sugirió por largo tiempo, que eran especies diferentes (Angen *et al.*, 1999), cepas del biotipo A se asociaban con pasteurellosis neumónica en el ganado y septicemia en corderos, mientras que cepas del biotipo T causaban una enfermedad sistémica bien definida en ovejas adultas y jóvenes (Davies *et al.*, 1996).

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) (Angen *et al.*, 1999). *Mannheimia haemolytica* es un patógeno mundialmente muy conocido en rumiantes (Kodjo *et al.*, 1999).

El género de *Mannheimia* tienen 5 especies: *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. ruminalis* y *M. varigena* (Blackalla *et al.*, 2002).

M. haemolytica reside normalmente en las criptas de las tonsilas de sus hospedadores, formando parte de la micropoblación habitual del ganado sano (Gutiérrez *et al.*, 2002).

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 y no fermentan la trealosa ni la manosa (Gutiérrez *et al.*, 2002).

M. glucosida comprende un grupo heterogéneo de organismos que tienen baja virulencia y son principalmente patógenos oportunistas de ovejas (Davies *et al.*, 2002). Contiene el serotipo 11 de *P. haemolytica* aislada de rumen de bovinos y ovinos (Gutiérrez *et al.*, 2003).

M. granulomatis aislada de ganado bovino y especies lepóridas, ha sido asociada con neumonía, conjuntivitis purulenta y con granulomas en piel, así como otras condiciones de enfermedad en el ganado; *M. ruminalis*, integrada por cepas no hemolíticas aisladas del rumen de ganado bovino y ovino, a los cuales, no se les asocia a condiciones de enfermedad y *M. varigena* aislada de bovinos y porcinos, la cual ha sido asociada con sépsis, neumonía y otros estados de enfermedad (Trigo, 2005).

Pasteurella multocida es un cocobacilo gram negativo, inmóvil, posee cápsula, no forma esporas, es aerobio y anaerobio facultativo (Kehrenberg *et al.*, 1998). Tiene aspecto bipolar en los frotis teñidos con Leishman o Wright (Gutiérrez *et al.*, 2003). Pertenece a la familia *Pasteurellaceae* y es un habitante normal del sistema respiratorio anterior (Mizan *et al.*, 2000), y digestivo en mamíferos y aves clínicamente sanos, por lo que son considerados invasores secundarios (oportunistas) al verse reducida la resistencia del animal por diferentes circunstancias, una combinación de estrés y agentes infecciosos. Las condiciones más comunes de estrés comprenden: el transporte, destete, aglomeraciones, cambios bruscos de temperatura ambiental confinamiento de animales de diferentes edades, entre otros (Trigo, 1991).

Los resultados del desarrollo de la prueba de hemaglutinación indirecta ahora reconocen que *P. Multocida* ha sido clasificada en 5 serotipos con base a sus antígenos capsulares (A, B, D, E y F) (Townsend *et al.*, 2001) y una vez eliminada su cápsula mediante un tratamiento con ácidos o con hialuronidasa se pueden distinguir hasta 16 antígenos de origen somático (1-16) (Ruffolo *et al.*, 1997). Las

serovariedades o serotipos se designan por el tipo capsular, seguido por el número que representa el tipo somático, por ejemplo, B:2 causa septicemia hemorrágica (Carter *et al.*, 1991).

El organismo también es un patógeno primario o secundario y es responsable para una amplia gama de enfermedades económicamente importantes en los animales domésticos a lo largo del mundo (Davies, 2004).

Las infecciones causadas por *P. multocida* incluyen cólera aviar que es causada por el tipo capsular A (Harper *et al.*, 2004). La rinitis atrófica progresiva en cerdos se asocia predominantemente con el tipo capsular de la cepa D, y la neumonía en bovinos, ovinos y cerdos está asociada principalmente por el tipo capsular de cepa A (Davies *et al.*, 1997). La septicemia hemorrágica en vacas y búfalos de agua en ciertas áreas enzoóticas de Asia y África es causada exclusivamente por los tipos capsulares B y E. El patógeno también ha sido asociado con la rinitis atrófica en cerdos, y la septicemia en ovejas. Además, *P. multocida* es responsable de infecciones en venados, causa enfermedad del tracto respiratorio de conejos, y está asociada con infecciones en humanos por mordedura de perros y gatos (Davies, 2004). Es más frecuente 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. Los gatos tienen la proporción más alta de colonización orofaríngea por *P. multocida* (50 al 90%), seguido por los perros (50 al 66%), cerdos (51%), y ratas (14%) (Chen, 2002).

Cuadro 1. Especies del género *Pasteurella*, sus hospedadores y las enfermedades que se encuentran asociadas (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
<i>P. stomatis</i>	Perros y gatos	Aparato respiratorio. No suele ser patógeno.
<i>P. caballi</i>	Equino	Infecciones respiratorias y neumonía.

Cuadro 1. (Continuación) Especies del género *Pasteurella*, sus hospedadores y las enfermedades que se encuentran asociadas (Gutiérrez *et al.*, 2002).

Especie (s)	Hospedador (s)	Enfermedad o localización anatómica
<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. trehalosi</i>	Ovinos	Septicemia en corderos viejos.

Cuadro 2. Especies del género *Mannheimia*, sus hospedadores y las enfermedades que se encuentran asociadas (Gutiérrez *et al.*, 2002).

Especie (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	Panuculitis fibrogranulomatosas. Aislada igualmente de la cavidad oral.
<i>M. varigena</i>	Ovino y porcino	Septicemia y neumonía también descritas cepas no patógenas.
<i>M. glucosida</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 sem.

2.2. Mecanismos de defensa del aparato respiratorio.

2.2.1. Mecanismos inespecíficos.

- a. **Eliminación mecánica.** (Nasal, traqueobronquial y alveolar).
- b. **Secreciones.** (Capa traqueobronquial (moco), capa alveolar (surfactante), lisozima, interferón, complemento).
- c. **Defensas celulares.** No fagocíticas: epitelio traqueobronquial, Fagocíticas: fagocitos sanguíneo (neutrófilos, monocitos), fagocitos tisulares (macrófagos alveolares). Células asesinas (K), y naturales (NK) (Trigo 1998).

2.2.2. Mecanismos específicos (inmunitarios).

- a. **Mecanismo dependientes de linfocitos B.** Inmunoglobulinas séricas (IgG, IgM), e inmunoglobulinas secretorias (IgA).
- b. **Mecanismos dependientes de linfocitos T.** Mediados por linfocinas (secretados por linfocitos T auxiliares), citotoxicidad celular directa efectuada por linfocitos T citotóxicos (Trigo 1998).

2.3. Epidemiología.

La Pasteurelisis neumónica del bovino (BPP) causada por *M. haemolytica* serotipo A1 ocasiona un problema económico mayor para las industrias ganaderas de ganado de carne y lecherías en América del Norte y Europa Occidental (Jeyaseelan *et al.*, 2001).

En la región de Tijuana, Baja California, México, la neumonía enzoótica es una de las enfermedades infecciosa mas comunes que afectan a las becerras lecheras. La enfermedad ocurre frecuentemente en becerras de uno a cinco meses de edad, con una incidencia mayor en animales nacidos durante el otoño y el invierno (Pijoan, 1999).

2.4. Patogenia de *Pasteurella* y *Mannheimia*.

La patología pulmonar observada en la neumonía de fiebre de embarque se atribuye a la leucotoxina de *M. haemolytica*. Mientras esta bacteria es parte de la flora normal del tracto respiratorio superior del ganado, no se observan los efectos destructivos de las leucotoxinas ahí. 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 (Marciel y Highlander, 2001).

El virus entra al animal por vía aérea y por su tamaño logra llegar a las células de la faringe, tráquea, bronquios, y bronquiolos introduciéndose en las células y replicándose en las mismas, si el animal está en buenas condiciones físicas resolverá la infección mediante la fagocitosis y mecanismo de defensa inespecíficos, pero si está inmunodeprimido por estrés (transporte, intervenciones quirúrgica, o aplicación de corticoesteroides) la proliferación viral se acentúa e incrementa la inmunosupresión. En este momento el bovino presenta fiebre e inapetencia, disminuye su consumo de alimento y está apático. Estos signos pueden pasar desapercibidos y el proceso dura entre 3 y 10 días (Christensen, 1995).

La destrucción del epitelio, la congestión de los tejidos, alteración de las funciones de los macrófagos y neutrófilos del pulmón, favorecen la proliferación de bacteriana. En este momento, *Pasteurella*, que se encuentra en la faringe del animal en forma normal se sale de control y prolifera, causando inicialmente una faringitis, acentuando el malestar del animal y pasa a la tráquea, bronquios y bronquiolos, ya sea mecánicamente o por vía linfática, ya que los fagocitos que actúan localmente llevan los gérmenes a los ganglios linfáticos (Christensen, 1995).

Es de esperarse que se realice la destrucción de las bacterias en los macrófagos, pero no sucede así pues se ha visto que se altera el mecanismo de destrucción del macrófago por lo que no se realiza la fusión fagolisosoma y las enzimas de los lisosomas no actúan, permitiendo de esta manera la sobre vivencia

de las bacterias y su proliferación en el tracto respiratorio. Al proliferar estas, los niveles de endotoxinas se incrementan provocando fiebre, ruptura de los endotelios vasculares, provocando hemorragia y dejando por lo tanto zonas sin irrigación, coágulos intravasculares y leucopenia. Estos efectos tienen una acción directa sobre la circulación pulmonar y si recordamos que la pleura es menos distensible el animal tendrá más dificultad para distender el pulmón y depurar la inflamación. Las secreciones se acumulan en el ángulo traqueobronquial, disminuyendo la luz de paso de aire y reteniendo gérmenes. La difusión del aire para la oxigenación se ve alterada al haber una perturbación en la presión sanguínea y zonas del pulmón quedan afuncionales al quedar sin irrigación forzando a las zonas sanas a responder a las exigencias respiratorias. La falta de oxigenación general por disfunción pulmonar, se acentúa cuando los niveles de endotoxinas en la sangre se encuentran elevados, provocando un choque vascular, con una vasodilatación central y vasoconstricción periférica, el corazón se somete a una sobrecarga y sobreviene la muerte (Christensen, 1995).

2.4.1. Factores de virulencia.

M. haemolytica se define como el agente causal de la neumonía en la fiebre de embarque, produce varios factores importantes para la inducción de la enfermedad. La leucotoxina es considerada el factor de virulencia primario, pero está claro que hay otros factores potenciales involucrados en su patogenia que incluyen el lipopolisacárido (Brogden *et al.*, 1995), 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).

2.4.1.1. Leucotoxina.

M. haemolytica secreta una leucotoxina que es letal para los leucocitos de rumiantes (Petras *et al.*, 1995). Esta leucotoxina es un miembro de la familia de las toxinas “repeat in toxin” (RTX) (Sun, 1999). La leucotoxina también es producida por

cepas de *M. glucosida* y *P. trehalosi* (Davies *et al.*, 2002). El presunto papel de la leucotoxina es la destrucción de leucocitos en el sitio de infección de esta manera reduce la capacidad del animal de mandar una respuesta inmune efectiva. La lisis de las células inmunes con la toxina también da como resultado la liberación de enzimas destructivas dentro del tejido pulmonar (Petras *et al.*, 1995).

Las toxinas (RTX) lisan células blanco mediante la formación transmembranal de poros. Muchas toxinas RTX, incluyendo la LKT de *M. haemolytica*, son también potentes estimuladores de leucocitos cuando están presentes en bajas concentraciones, induciendo la expresión de citocinas proinflamatorias, que favorecen la severidad de las lesiones, tal es el caso del leucotrieno B4 (LTB4), el cual es un importante agente quimiotáctico para leucocitos polimorfonucleares en el desarrollo de la neumonía fibrinopurulenta aguda del ganado (Wang *et al.*, 1998).

La leucotoxina se codifica con un operon compuesto de cuatro genes, *lktA*, *lktB*, *lktC*, y *lktD*. El gen estructural es *lktA* y requiere el producto de *lktC* para la activación; los genes restantes, *lktB* y *lktD*, codifican proteínas que se encuentran en la secreción de la toxina (Murphy *et al.*, 1995).

2.4.1.2. Lipopolisacárido.

Ha sido mejor estudiado en el serotipo A1, es el componente mayor de la membrana de la bacteria gram-negativa (Li y Clinkenbeard 1999) y comprende del 10 al 25% del peso seco de la bacteria. Presenta el lípido A, se le considera como uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria. Las lesiones que induce, constan de grandes áreas de hiperemia y edema que abarcan zonas de deposición de células inflamatorias invadiendo en ocasiones lóbulos adyacentes, además pueden observarse también focos de hemorragia y adherencia fibrinosas (Trigo y González, 2005).

Se considera que el LPS juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad causada por *P. multocida*. Recientemente se mostró que el LPS de *P. multocida* ayuda a la adhesión de neutrófilos y la migración a través de células endoteliales (Harper *et al.*, 2004).

2.4.1.3. Proteínas de membrana externa.

Las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias gram negativas tienen un importante papel en el proceso de infección. Algunas PME tienen función de porinas que permiten el transporte de sustancias a través de la membrana externa, mientras que la fosfolipasa A, es esencial en ciertos patógenos para la invasión a las células del hospedador. Otras PME pueden actuar como receptores de alta afinidad para obtener hierro del hospedador (Trigo y González, 2005).

2.4.1.4. Fimbrias.

Las fimbrias de las bacterias gram negativas son estructuras filamentosas de unión no permanente formadas por la agrupación de una proteína denominada pilina o fimbriolina. Los receptores de este tipo de adhesina son carbohidratos de la superficie de la mucosa epitelial (Domínguez, 2002), por lo tanto estimulan la colonización del tracto respiratorio superior (Radostits *et al.*, 2002).

2.4.1.5. 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 (Gutiérrez *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 desecación y resistencia del hospedero a la defensa inmune (Lo *et al.*, 2001). Esta estructura bloquea físicamente los antígenos de superficie presente en la pared bacteriana, evitando así la acción de los anticuerpos. Promueve la resistencia de las bacterias a infecciones por bacteriófagos al ocultar los receptores específicos para estos virus, e inhibe el acceso de los receptores que la célula fagocítica tiene para adherirse al componente C3B del complemento (Gutiérrez y Smith 1993).

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).

2.4.1.6. 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 piensan que la neuraminidasa deslisa las glicoproteínas salivales, permitiendo que los organismos patógenos pueden 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. Se ha demostrado que todos los serotipos de *M. haemolytica* producen neuraminidasa y que las enzimas asociadas son de 150 a 200 kD (Highlander, 2001).

Scharmann *et al.* demostraron que 102 de 104 cepas de *P. multocida* producían 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).

2.4.1.7. Sialidasa.

La sialidasa es una enzima que degrada el ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos. Se supone que la sialidasa contribuye a la virulencia de algunos organismos patógenos, sobre todo aquéllos que habitan e invaden las mucosas (Gutiérrez *et al.*, 2002). Se ha encontrado la producción de sialidasa en aislamientos bacterianos de *Clostridium* y *Vibrio cholerae*. La sialidasa se ha dividido en dos grupos basados en el tamaño. La sialidasa de *Salmonella* y la de *Clostridium perfringens* son de aproximadamente 40 kDa y se considera que son miembros de la familia de sialidasas "pequeñas", mientras que la sialidasa *V. cholerae* es mayor de 80 kDa (Mizan *et al.*, 2000).

2.5. Manifestaciones clínicas.

Pasteurella y *Mannheimia* se manifiestan de distintas maneras en el ganado lechero, dependiendo de la edad del animal, organismo (s) involucrados y estadios de la enfermedad, entre otros factores. El tracto respiratorio es el sitio más común de infección para *Pasteurella*. La neumonía es la manifestación más común de infección respiratoria causada por *Pasteurella* (Chen *et al.*, 2002). La fiebre de embarque ocurre frecuentemente en el ganado después del transporte y se caracteriza por fiebre (41-42 °C), disnea (Storz *et al.*, 2000), depresión, inapetencia, descarga nasal y ocular serosa, descarga nasal purulenta (Radostits *et al.*, 2002), éstasis, morro con costras, salivación ligera, diarrea, respiración rápida y tos superficial cuando el animal se mueve. En casos severos hay pleuresía y respiración irregular. La auscultación del pulmón puede revelar estertores húmedos, fricción pleural y crepitación (Merck, 1993).

2.6. Lesiones.

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

Las lesiones pulmonares son causadas por la infección de *M. haemolytica* se caracterizan por la infiltración extensa de neutrófilos y exudado de fibrina en las vías aéreas, alvéolos (Wang *et al.*, 1998), y acumulaciones en el septo interlobular (Yoo *et al.*, 1995), que forman adherencias entre los diferentes órganos de la cavidad torácica (Wang *et al.*, 1998).

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

Otras lesiones que aparecen después incluyen hemorragia, trombosis vascular, necrosis coagulativa del parénquima, y formación de abscesos. Estas lesiones pulmonares han ocurrido naturalmente en casos de infección (Yoo *et al.*, 1995).

En infecciones por *Pasteurella multocida* las lesiones presentes son bronquitis y bronconeumonía supurativa (Merck, 1993).

Las figuras 1, 2, 3 y 4 muestran las lesiones macroscópicas de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia Haemolytica*.

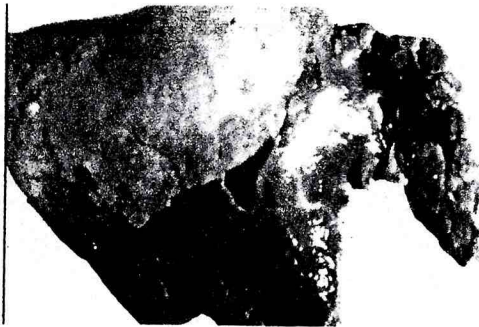


Figura 1. El pulmón afectado esta consolidado, tiene una apariencia lobulillar acentuada y el color varía de rojo intenso en casos agudos (hiperemia) a gris en casos crónicos (inflamación, atelectasia, fibrosis) por *P. multocida*.



Figura 2. Los bronquios contienen exudado purulento el cual es fácilmente visible al comprimir el parénquima pulmonar. En los casos más crónicos, el exudado se vuelve más mucoso debido a la hiperplasia de células caliciformes (*P. multocida*).



Figura 3. Presencia de fibrina sobre las superficies pleurales por *M. haemolytica*

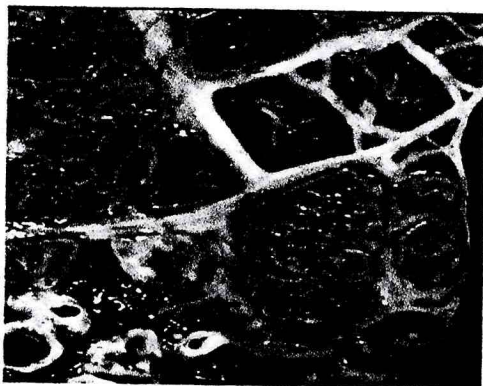


Figura 4. Depósitos de fibrina en pulmón por *M. haemolytica*.

(Fotos tomadas de López, 2004).

2.7. Diagnóstico.

2.7.1. Aislamiento bacteriológico e identificación.

La precisa detección de laboratorio de *P. multocida* y *M. haemolytica* depende del aislamiento e identificación de las colonias bacterianas sospechosas, por el microscopio y pruebas bioquímicas (Townsend *et al.*, 1998).

La toma de muestras depende de la enfermedad y de la especie animal. En casos de neumonía deben tomarse del borde de la lesión. 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 (Townsend *et al.*, 1998). En animales vivos, se puede recoger muestras de pus, exudados, hisopos nasales, lavados bronquiales y leche procedente de mamas inflamadas (Gutiérrez 2002).

El medio habitual para el aislamiento de las *Pasteurellas* es el agar sangre de bovino (Trigo 1991). Las colonias se hacen visibles después de 24 horas a una temperatura de 37° C (Carter *et al.*, 1991).

Las colonias de *P. multocida* miden de 2 a 3 mm de diámetro, son circulares, grisáceas, algunas cepas producen colonias mucoides grandes, los cultivos frescos pueden tener un olor característico y no producen hemólisis. En el caso de *M. haemolytica* las colonias son circulares, grisáceas, más pequeñas que las de *P. multocida* y son capaces de producir hemólisis completa que en ocasiones no es más grande que la colonia. La sangre de bovinos es más adecuada que la de caballos para la demostración de hemólisis (Carter *et al.*, 2003).

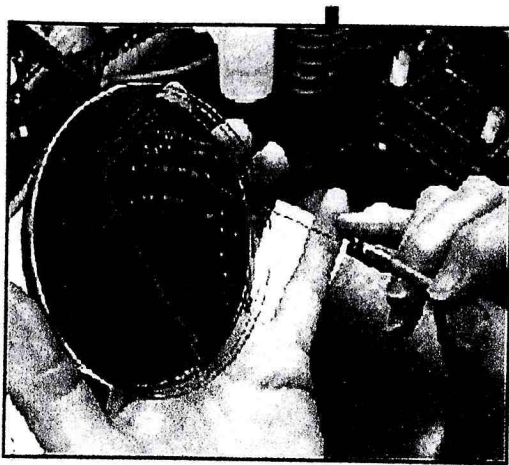


Figura 5. Identificación de colonias de *P. multocida* y *M. haemolytica*.

(Foto tomada de López, 2004).

Después del aislamiento primario las cepas bacterianas sospechosas se tiñen con la tinción de Gram y se observan al microscopio (Pijoan *et al.*, 1999).

Cuadro 3. Diferenciación entre los géneros *Pasteurella* y *Mannheimia*, utilizando pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Mannheimia Haemolytica</i>
Oxidasa	+	+
TSI	Reacción de acidez	Reacción de acidez
Motilidad	-	-
Glucosa	+	+
Hemólisis	-	+
Crecimiento en MacConkey	-	+ a
Reducción de nitrato	+	+
Indol	+	-
Urea	-	-

2.7.2. Análisis histopatológico.

Para el examen histopatológico, se toman muestras de las lesiones del tejido pulmonar las cuales son fijadas en formalina amortiguada al 10% durante 48 horas, posteriormente son incluidas en parafina y procesadas por la técnica histológica de rutina con tinción de hematoxilina y eosina (HE) y finalmente se observan al microscopio (Juárez *et al.*, 2003).

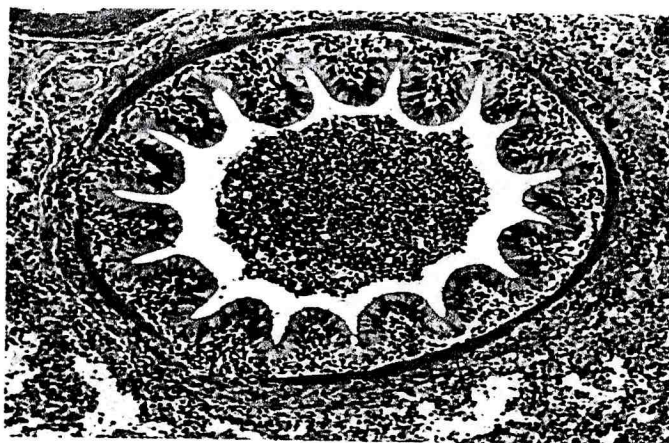


Figura 6. Gran número de neutrófilos en los espacios bronco alveolares (forma aguda) por *P. multocida*.

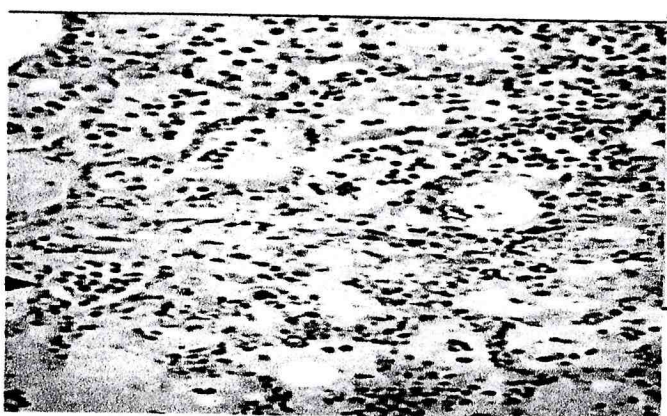


Figura 7. Pérdida total de los espacios aéreos debido a una exudación exuberante de fibrina, neutrófilos hacia el lumen de los bronquios, bronquiolos y alvéolos por *M. haemolytica*.

(Fotos tomadas de López, 2004).

2.7.3. Otros métodos empleados para identificación de *P. multocida* y *M. haemolytica*.

Se han empleado técnicas de hemaglutinación indirecta para identificar cepas de *M. haemolytica* y *P. multocida* (Kodjo *et al.*, 1999). Otras han sido la de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la caracterización de las principales especies de estos géneros: *P. multocida*, *P. pneumotropica*, *P. trehalosi*, *M. granulomatis* y *M. haemolytica* (Townsend *et al.*, 1998).

En cuanto a la caracterización molecular de los aislamientos de *P. multocida*, en los últimos años se han realizado una gran cantidad de aportaciones, especialmente con el propósito de mejorar su eficacia en estudios epidemiológicos. Los métodos empleados son: el análisis por endonucleasas de restricción (AER), la ribotipificación y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Davies, 2004).

2.8. Tratamiento.

Aunque el Complejo Respiratorio Bovino (CRB) puede iniciarse por una variedad de agentes patógenos, debido a la importancia que reviste *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, y *Haemophilus sommnus*, como los microorganismos que producen las principales lesiones pulmonares, la terapia antibiótica debe concentrarse en combatir estos tres agentes (Pijoan y Aguilar 2000).

Se han usado Tetraciclinas para el tratamiento y la prevención de enfermedades en las que *Pasteurella* está involucrada (Kehrenberg *et al.*, 1998).

Estudios anteriores han indicado que algunos macrólidos pueden tener las propiedades antiinflamatorias reduciendo la acumulación de células inflamatorias como PMNs, leucocitos mononucleares, y linfocitos; disminuyendo las funciones secretorias de vías aéreas de las células secretorias; en las vías aéreas del epitelio aumenta la motilidad ciliar; y la síntesis del epitelio decreciente de citocinas

proinflamatorias como la interleucina-6. Recientes evidencias sugieren que la eritromicina y otros macrólidos puedan inducir apoptosis de PMN “*in vitro*”. Tratamientos de tilmicosina exhiben niveles elevados de apoptosis y la síntesis de leukotrienos B4 en los pulmones infectados de estos animales está reducida (Chin *et al.*, 2000). 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 período corto (Sarasola *et al.* 2002).

Cuadro 4. Antibióticos empleados para el tratamiento y prevención de la pastereulosis bovina (Radostits *et al.*, 2002).

Antibiótico	Dosis y vía de administración
Tratamiento individualizado	
Oxitetraciclinas	10 mg/kg, IM o IV , x 3 días
Florfenicol	20 mg/Kg. IM repetida las 48 hrs.
Trimetoprim – sulfadoxina	20 mg/Kg. , IM repetida las 48 hrs.
Penicilina	20 000 – 30 000 UI /kg IM o SC x 3 días.
Sulfametazina	250 mg/Kg. cada 72 hrs.
Tilmicosina	10 mg/Kg. SC. Repetir a las 72 si es necesario
Tratamiento colectivo (pienso y agua)	
Sulfametazina	100 mg/Kg. en agua diariamente de 5 a 7 días
Oxitetraciclina	3 a 5 mg/ Kg. en pienso durante 7 días
Tratamiento colectivo (individualizado)	
Oxitetraciclinas de acción prolongada	20 mg/Kg. IM a todos los animales en contacto
Tilmicosina	10 mg/Kg. SC.

2.9. Resistencia a antimicrobianos.

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

Sin embargo, un gran problema que enfrentan los veterinarios es decidir que tipo de antibióticos usar y en que 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 y Aguilar 2000). En México existe muy poca información confiable sobre los niveles de resistencia antimicrobiana, la información disponible tiene más de 10 años de haberse publicado (Pijoan y Aguilar 2000).

Con base en estudios realizados en México, Salas *et al.*, mostraron una alta proporción de cepas de *Pasteurella* spp. aisladas de bovinos sacrificados en rastros, sensibles a la ampicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina y trimetropim-sulfametoxazol (Pijoan y Aguilar 2000).

La primera resistencia a las Tetraciclinas se descubrió en 1993 y se obtuvo de un aislamiento de *Pasteurella multocida* en 1975 de tejidos de un pavo en California que murió de cólera aviar (Kehrenberg *et al.*, 2003). Los estudios de resistencia a las tetraciclinas en *P. multocida* y *M. haemolytica* revelan porcentajes altos en los aislamientos (Kehrenberg *et al.*, 1998).

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 macrolidos 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.* destacaron la alta incidencia encontrada en un estudio, de cepas de *Pasteurella* spp, así como de *H. somnus* resistentes a la tilmicocina, 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) sí muestran una alta efectividad “*in vitro*” contra los agentes estudiados (Pijoan y Aguilar, 2000).

Cuadro 5. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Mannheimia haemolytica* a antibióticos (Pijoan y Aguilar, 2000).

RESISTENTES %	SENSIBLES %
kanamicina 100 %	Cefotaxima 100 %
Lincomicina 100 %	Cefalexina 67.7 %
Penicilina 85.7 %	Mezlocilina 67.7 %
Estreptomicina 83.9 %	Sulfametoxazol – trimetoprim 64.5%
Ampicilina 78.5 %	Amoxicilina 51.6 %

Cuadro 6. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Pasteurella multocida* a antibióticos (Pijoan y Aguilar 2000).

RESISTENTE %	SENSIBLE %
Lincomicina 97%	Cefotaxima 97%
Kanamicina 93.9%	Cefalexina 81.8%
Estreptomicina 66.7%	Gentamicina 63.6%
Oxitetraciclina 63.9%	Eritromicina 51.5%

Recientemente Singer demostró la importancia de determinar regionalmente los patrones de resistencia de *Pasteurella* spp., a diversos antibióticos ya que observaron variaciones muy significativas en la efectividad de la ampicilina y tetraciclina en bovinos de diferentes regiones (Pijoan y Aguilar 2000).

2.10. Prevención.

Una meta de investigación es determinar cual de los factores de virulencia es el objetivo para aprovecharse mejor en el desarrollo de nuevas terapéuticas efectivas o vacunas. La inmunización disminuye el daño pulmonar al desafío experimental con *M. haemolytica*, así como las manifestaciones clínicas en los animales (Morales *et al.*, 1993).

Un acercamiento usado para la significativa evaluación de varios componentes en la infección de *M. haemolytica* ha sido determinar si la inmunización con proteínas daría resultados en protección para el desafío en la infección. Vacunas usadas en *M. haemolytica* con elementos sin el antígeno de leucotoxina significativa han sido de eficacia variable. Sin embargo, la adición de leucotoxina a una vacuna ha mejorado su efectividad (Chidambaram *et al.*, 1995)

3. Justificación.

En México hay estudios documentados relacionados con neumonías causadas por *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos, en varios estados del país (Trigo 1991). Y de acuerdo a los antecedentes descritos, las enfermedades respiratorias son una importante causa de pérdidas económicas a nivel nacional. Sin embargo, no hay estudios que indiquen la situación actual de la frecuencia de esta bacteria en la Comarca Lagunera, de acuerdo a esto, 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.

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

4.2. Objetivos Específicos.

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

4.2.2. Determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y/o *Pasteurella multocida* a partir de hisopos nasales obtenidos de bovinos Holstein clínicamente y enfermos de neumonía en 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 Nazas y el Aguanaval, hasta antes de la construcción de las presas Lázaro Cárdenas y Francisco Zarco, que en la actualidad regulan su afluente

<http://comarcalagunera.com/portal/laguna>



Figura 8. Localización de la Comarca Lagunera.

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

<http://comarcalagunera.com/portal/laguna>



Figura 9. 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 10. Comarca lagunera de Coahuila

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

<http://comarcalagunera.com/portal/laguna>

6. Material y métodos.

Se realizó un estudio de tipo 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 UP.

El muestreo se llevó a cabo de octubre del 2004 a marzo del 2005 en forma no aleatoria ya que fue por criterio en 20 hatos tomándose el 100% de los animales enfermos, divididos en animales menores de un año y mayores de un año, que presentaron evidencias clínicas de neumonías. Se obtuvieron muestras de exudado nasal mediante hisopos estériles con un medio de transporte de *Stuart*, las cuales se transportaron en refrigeración hasta el lugar de trabajo.

La fase de laboratorio se realizó en la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, y en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, en Palo Alto, México D.F. Las muestras se sembraron en agar sangre, se identificaron con tinción de Gram y pruebas bioquímicas de acuerdo a las técnicas microbiológicas de rutina.

7. Resultados.

De las 20 unidades productivas estudiadas se muestrearon 111 animales clínicamente enfermos de neumonías de los cuales 73 fueron de animales menores de un año y 38 muestras de animales mayores de un año.

De los estudios microbiológicos realizados se logró el aislamiento de *Pasteurella multocida* en 26 casos (23.4%) seguido de *Mannheimia haemolytica* en 11 casos (9.9%), y ambas bacterias (*Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*) en 7 casos (6.3%); obteniendo un total de 44 muestras positivas (39.6%) a partir de hisopos nasales.

Cuadro 7. Relación de establos muestreados en la Comarca Lagunera para aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en animales clínicamente enfermos.

Nº UP	< 1 año	> 1 año	Total N	Población Total
1	6	0	6	4400
2	1	0	1	500
3	0	0	0	1050
4	0	11	11	6000
5	0	4	4	2850
6	4	0	4	2200
7	1	0	1	2000
8	6	0	6	2000
9	3	0	3	1000
10	2	0	2	2500
11	18	13	31	1150
12	0	0	0	1000
13	0	0	0	950
14	10	2	12	2000
15	2	6	8	2800
16	6	0	6	500
17	7	0	7	1200
18	6	0	6	1500
19	0	2	2	500
20	1	0	1	750
Total	73	38	111	36850

Cuadro 8. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en animales clínicamente enfermos.

Nº UP	Total de n	Aislamientos							
		<i>Mh</i>	%	<i>Pm</i>	%	<i>Pm/Mh</i>	%	Total	%
20	111	11	9.9	26	23.4	7	6.3	44	39.6

Cuadro 9. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en animales clínicamente enfermos menores de un año.

Nº UP	Total de n	Aislamientos							
		<i>Mh</i>	%	<i>Pm</i>	%	<i>Mh/Pm</i>	%	Total	%
20	73	9	12.33	22	30.13	7	9.59	38	52.05

Cuadro 10. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en animales clínicamente enfermos mayores de un año.

Nº UP	Total de n	Aislamientos							
		<i>Mh</i>	%	<i>Pm</i>	%	<i>Mh/Pm</i>	%	Total	%
Total	38	2	5.26	4	10.52	0	0	6	15.78

8. Discusión.

De acuerdo a un estudio realizado por Blanco *et al.*, en los rastros de Ferreria 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, Perú, 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 23.4% y de *M. haemolytica* en un 9.9 % y aislamientos mixtos, de ambas bacterias, en un 6.3 %.

Las neumonías son, probablemente, las causas de pérdidas más significantes en la ganadería bovina mundial. Las incidencias, sin embargo, varían de un lugar a otro, la etiología y patogenia es producto de la interacción de muchos factores incluyendo hospedero, agente y el medio ambiente. Dentro de la multiplicidad de factores, el agente es sin lugar a dudas el factor determinante y responsable de la severidad clínica de la neumonía observada en el campo.

9. Conclusiones.

- Es mas frecuente encontrar *Pasteurella multocida* que *Mannheimia haemolytica* en bovinos Holstein clínicamente enfermos 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 enfermos de neumonía en La Comarca Lagunera.
- La probabilidad de encontrar *Mannheimia haemolytica* o *Pasteurella multocida* o ambas es mayor en bovinos Holstein clínicamente enfermos menores de un año que en los mayores de un año.

10. Literatura citada.

1. **Angen, Ø., R. Mutters, D.A. Caugant, J.E. Olsen and M. Bisgaard** (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 *annheimia varigena* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 67-86.
2. **Blanco, M.T., Morán, F.J. y Pérez, C.** (2002). Resistencia bacteriana. Valoración de antimicrobianos. Tomado de Vadillo S., Píriz S. and Mateos E. Manual De Microbiología Veterinaria. Edit. McGraw-Hill- interamericana. 133-143. (1).
3. **Blanco, V.F., Trigo, T.F., Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Tapia, P.G. y 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. Méx.* 24(2): 107-112.
4. **Blackalla, P., Bisgaard, M., and Stephens, C.P.** (2002). Phenotypic characterisation of Australian sheep and Cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia Granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aust Vet J.* 80: 1 - 2.
5. **Biberstein, E.L.** (1990). *Pasteurella* Tomado de Biberstein E. L., y Chung Y. Tratado de Microbiología Veterinaria. Edit. Acribia. 195-200.
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. *Infection And Immunity.* 63 (9):3595-3599.
7. **Carter, G.R y Chengappa, M.M.** (1991). Bacteriología y Micología Veterinarias. 2ª. Edición Editorial el manual moderno Pág. 303-312.
8. **Christensen, R.** (1995.) Complejo Respiratorio Infeccioso Bovino (CRB). Memorias XIX Congreso Nacional de Buiatría. Torreón, Coahuila. Pág. 1-8.

9. **Chen, H.I., Hulten, K., and Clarridge, J.E.** (2002). Taxonomic Subgroups of *Pasteurella multocida* Correlate with Clinical Presentation. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (9): 3438–3441.
10. **Chidambaram, M., Sharma B., Petras S.F., Reese, C.P., Froshauer, S. and Weinstock, G.M.** (1995) Isolation of *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin Mutants. *Infection and Immunity*. 63 (3) 1027-1032.
11. **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. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 44 (9):2465-2470.
12. **Davies, R., Paster, J. and Dewhirst, F.** (1996). Phylogenetic Relationships and Diversity within the *Pasteurella haemolytica* Complex Based on 16S rRNA Sequence Comparison and Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide Analysis. *Journal of Systematic Bacteriology*. 46 (3):736-744.
13. **Davies R., Arkinsaw S., and Selander R.** (1997). Evolutionary Genetics of *Pasteurella haemolytica* Isolates Recovered from Cattle and Sheep. *Infection and Immunity*. 65 (9):3585-3593.
14. **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*. *Journal of Bacteriology*. 184 (1): 266–277.
15. **Davies, R.** (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: 4199-4210.
16. **Domínguez, L. and Gibello, A.** (2002). Patogenicidad e infección. Tomado de Vadillo S., Píriz S. and Mateos E. Manual De Microbiología Veterinaria. Edit. McGraw-Hill- Interamericana. Pág 221.
17. **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. *Infection And Immunity*. 65 (7):2593-2598.

18. **Gutiérrez, J. A. y Smith, J.E.** (1993). Determinación de la presencia de ácido hialurónico en el material capsular de cepas *Pasteurella multocida* tipos A y D aisladas de pulmones de cerdo. *Rev. Vet. Méx.* 24 (2):113-116.
19. **Gutiérrez, C.B., De La Puente, V.A. y Rodríguez, E.F.** (2002). Géneros *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Mannheimia*. Tomado de Vadillo S., Píriz S. y Mateos E. Manual De Microbiología Veterinaria. Edit. McGraw-Hill-interamericana. 357-377.
20. **Gutiérrez, J.A., Aguilar, F., Suárez, F. y Hernández, R.** (2003). Bacilos gram negativos asociados al aparato respiratorio. Tomado de manual de Prácticas de laboratorio de Bacteriología y Micología veterinarias. FMVZ. UNAM.
21. **Harper, M., Cox, A.D., Michael, F.S., Wilkie, I.W., Boyce, J.D., and Adler, B.** (2004). A Heptosyltransferase Mutant of *Pasteurella multocida* Produces a Truncated Lipopolysaccharide Structure and Is Attenuated in Virulence. *Infection and Immunity.* 72 (6):3436–3443.
22. **Highlander, S.K.** (2001). Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci.* 6: D1128-50.
23. **Jeyaseelan, S., Kannan, M.S., Briggs, R.E., Thumbikat, P., and Maheswaran S.K.** (2001). *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin Activates a Nonreceptor Tyrosine Kinase Signaling Cascade in Bovine Leukocytes, Which Induces Biological Effects. *Infection And Immunity.* 69 (10):6131-6139.
24. **Juárez, F., Trigo, F.J., Chávez, G. y Vargas, R.E.** (2003). Identificación de agentes virales por inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda. *Rev. vet. Méx.* 34 (1):1-13.
25. **Kehrenberg, C., Werckenthin, C. and Schwarz, S.** (1998). Tn5706, a Transposon-Like Element from *Pasteurella multocida* Mediating Tetracycline Resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 42 (8):2116–2118.
26. **Kehrenberg, C., Nga Thi Thu Tham, and Schwarz, S.** (2003). New Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Pasteurella multocida*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 47 (9):2978-2980.
27. **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. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (2): 380-385.
28. **Kuhnert, P., Korczak, B., Falsen, E. and Straub, R.** (2004). *Nicoletella semolina* gen. nov., sp. nov., a New Member of *Pasteurellaceae* Isolated from Horses with Airway Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (12):5542–5548.
 29. **Li, J. and Clinkenbeard, K.D.** (1999). Lipopolysaccharide Complexes with *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Infection And Immunity*. 67(6):2920-2927.
 30. **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):4458-64.
 31. **López, M.A.** (2004). Memorias del seminario sobre Patología del Sistema Respiratorio. FMVZ. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria , Tam.
 32. **Marciel A. M. and Highlander S. K.** (2001) Use of Operon Fusions in *Mannheimia haemolytica* To Identify Environmental and cis-Acting Regulators of Leukotoxin Transcription. *Infection and Immunity*. 69 (10):6231–6239
 33. **Merck y Co., Inc.** (1993). Manual Merck de veterinaria 4a. Edición Editorial Océano grupo Barcelona España. 833-834.
 34. **Mizan, S., Henk, A., Stallings, A., Maier, M, and Lee, M.D.** (2000). Cloning and Characterization of Sialidases with 2-69 and 2-39 Sialyl Lactose Specificity from *Pasteurella multocida*. *Journal Of Bacteriology*. 182 (24):874–6883.
 35. **Morales, J.F., Jaramillo, L., Oropeza, Z., Tórtora, J.L., Trigo, T.F. y Espino, G.** (1993). Evaluación Experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Rev. Vet. Méx.* 24 (2):97-105.
 36. **Murphy, G.L., Whitworth, L.C., Clinkenbeard, K.D., and Clinkenbeard, P.A.** (1995). Hemolytic Activity of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Infection And Immunity*. 63 (8):3209–3212.
 37. **Petras, S.F., Chidambaram, M., Illyes, E.F., Froshauer, S., Weinstock, G.M. and Reese, C.P.** (1995). Antigenic and Virulence Properties of *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin Mutants. *Infection And Immunity*. 63 (3):1033–1039.

38. Pijoan, P., Morales, J.F. y Aguilar, F. (1999). Caracterización de los procesos neumónicos en becerros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Rev. Vet. Mex.* 30 (2): 49-155.
39. Pijoan, P. y Aguilar, F. (2000). Resistencia y Sensibilidad a Antimicrobianos en Cepas de *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Hemophilus sommus*. *Rev. Vet. Mex.* 31 (2):153-156.
40. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., y Hinchcliff, K.W. (2002). Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino, equino. Edit. McGraw-Hill- Interamericana. 981-1007.
41. 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*. *Infection and Immunity.* 65 (1):339-343.
42. 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.
43. 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. *Journal Of Clinical Microbiology.* 38 (9):3291-3298.
44. SISCCOMcomarcalagunera.com (2005).
<http://comarcalagunera.com/portal/laguna>
45. Sun, Y., Clinkenbeard, K., Cudd, L.A, Clarke, C.R. and Clinkenbeard, P.A. (1999). Correlation of *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin Binding with Susceptibility to Intoxication of Lymphoid Cells from Various Species: *Infection and Immunity.* 67 (12):6264-6269.
46. 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. *Journal Of Clinical Microbiology.* 36 (4):1096-1100.

47. **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. *Journal Of Clinical Microbiology*. 39 (3):924-929.
48. **Trigo, T.F.** (1991). Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Rev. Vet. Méx.* 22 (2): 31-134
49. **Trigo T.F.** (1998) Patología Sistémica Veterinaria. 3ª. Edición. Edit. McGraw-Hill interamericana. Pág 33-84.
50. **Trigo, T.F. y González, C.** (2005). Avances Sobre la Patogenia de la Neumonía Bovina Producida por *Mannheimia (Pasteurella) Haemolytica*. Memoria XXVI Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco Guerrero.
51. **Yoo, H.S, Maheswaran, S.K., Lin, G., Townsend, E.L., and Ames, T.R.** (1995). Induction of Inflammatory Cytokines in Bovine Alveolar Macrophages following Stimulation with *Pasteurella haemolytica* Lipopolysaccharide. *Infection And Immunity*. 63 (2):381-388.
52. **Wang, Z., Clarke, C., and Clinkenbeard, K.** (1998). *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin-Induced Increase in Phospholipase A2 Activity in Bovine Neutrophils. *Infection and Immunity*. 66 (5):1885-1890.
53. **White, D., Jolley, W., Pudy, C. and Straus, D.** (1995). Extracellular Neuraminidase Production by a *Pasteurella multocida* A:3 Strain Associated with Bovine Pneumonia; *Infection and Immunity*, 63(5):1703-1709.
54. **Sanabria, V., Rivera, G.H. y 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 becerrerías o si se encuentra en corrales junto a parideros.
 - 5.2. Anotar si el becerro se encuentra dentro de naves, en becerrerías 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 11. Picadura con asa recta.

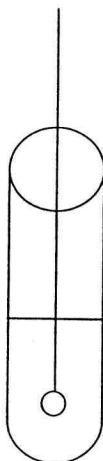
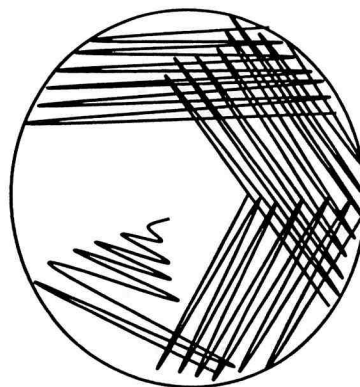


Figura 12. Siembra para aislamiento en cultivo.

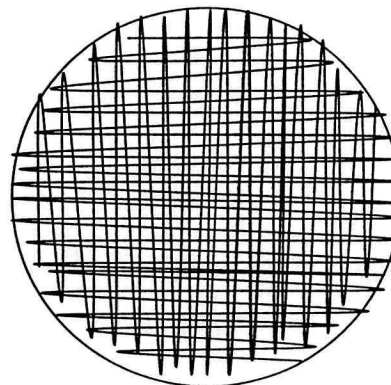


- Depositar el inóculo en el cuadrante 1 únicamente.
- Flamear y enfriar el asa entre cuadrante.
- Asegurar que exista contacto entre las estrías de cada cuadrante (1 con 2, 2 con 3 y 3 con 4).

Figura 13. Siembra por picadura en el fondo del tubo y en estría sobre la superficie.



Figura 14. Siembra en estría.



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.

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 mostraran 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 estría, 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 isomílico, 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 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.