

Universidad de Guadalajara

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Aislamiento e Identificación de Bacterias Patógenas
a Partir de Pulmones Neumónicos de Bovinos
Procedentes del Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.
Tesis Profesional

Que Para obtener el Título de:

Médico Veterinario Zootecnista
Presenta:

Ernesto Sandoval Gómez

Asesor: M.V.Z. Dr. Hugo Castañeda Vázquez

Guadalajara, Jalisco.

Enero de 1990.

El presente trabajo fue realizado
en el Departamento de Investigación
Científica de la Fac. de Medicina
Veterinaria y Zootecnia.

Bajo la asesoría del Dr. Hugo Castañeda
Vázquez.

I N D I C E .

| | Paginas |
|---|---------|
| 1.- Introduccion | 1 |
| Etiologia | 1-2 |
| Signos Clinicos y Curso de la Enfermedad | 3-4 |
| Identificacion de los Agentes Patogenos | 5-6 |
| Pasteurella (<i>P. multocida</i> y <i>P. haemolytica</i>) | 5-8 |
| <i>Pseudomona aureoginosa</i> | 8-10 |
| Mycoplasma | 10-12 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 13-14 |
| <i>Haemophilus somnus</i> | 15-16 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 17-19 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 19-20 |
| <i>Corynebacterium pyogenes</i> | 20-21 |
| | |
| 2.- Justificacion | 22 |
| 3.- Hipotesis | 23 |
| 4.- Planteamiento del Problema | 24 |
| 5.- Objetivos | 25 |
| | |
| 6.- Material y Metodos | 26 |
| Obtencion de las Muestras | 26 |
| Procesamiento de las Muestras | 26-29 |
| Identificacion Bioquimica | 29-31 |
| Pruebas de Patogenicidad | 32 |
| Determinacion de las U.F.C. | 33 |

| | |
|--------------------|-------|
| 7. - Resultados | 34-41 |
| 8. - Discusion | 42-44 |
| 9. - Conclusiones | 45 |
| 10. - Resumen | 46-47 |
| 11. - Bibliografia | 48-51 |

1. INTRODUCCION.

La explotación bovina representa una actividad económica importante en nuestro país. Sin embargo dicha actividad ganadera se encuentra limitada constantemente por varios factores, entre los cuales las enfermedades ocupan un lugar importante. Dentro de ellas, la neumonía, enfermedad del aparato respiratorio de los bovinos, afecta a animales de todas las edades y es uno de los problemas más serios que merman la industria ganadera. Ocupó el primer lugar como causa de mortalidad en bovinos productores de carne y leche. Tabla No. 1 (1, 4, 11, 15, 20, 23).

ETIOLOGIA.

Los agentes causales más comunes de neumonías son virus o bacterias y ocasionalmente otros organismos, ya sea en infecciones sencillas o mezcladas. El proceso infeccioso se ve influenciado por los factores predisponentes, los cuales incluyen cansancio o debilidad por transporte prolongado, cambios repentinos en el clima, confinamiento en lugares poco ventilados, sucios, lodosos o pestilentes y por efectos debilitantes de mala nutrición o por alguna enfermedad. En algunas ocasiones se observa que los agentes secundarios, son parte de la flora normal de las vías aéreas y que llegan a tener un papel patógeno cuando disminuyen las defensas del animal (1, 12, 16).

La neumonía es frecuentemente un factor complicante de algunas enfermedades virales, como en la influenza porcina. Entre las causas bacterianas la Pasteurella multocida es recuperada frecuentemente de la neumonía del bovino, conejo y cerdo. (5, 12, 36).

TABLA I. Incidencia de Pasteurellosis bovina en Jalisco.

| CASOS REGISTRADOS | AÑO | | | | | TOTAL |
|---------------------|------|------|------|------|------|-------|
| | 1982 | 1983 | 1984 | 1985 | 1986 | |
| Morbilidad de | | | | | | |
| Pasteurellosis (*) | 625 | 74 | 20 | 9 | 72 | 800 |
| Mortalidad de | | | | | | |
| Pasteurellosis (**) | 103 | 60 | 18 | 7 | 17 | 205 |

Fuente: Centros de Salud Animal de la S.A.R.H. en el estado de Jalisco.

(*) Ocupa el tercer lugar como causa de morbilidad en el ganado bovino.

(**) Ocupa el primer lugar como causa de mortalidad.

SIGNOS CLINICOS Y CURSO DE LA ENFERMEDAD.

El inicio de la infección neumónica es comunmente repentino, hay un aumento rapido de la temperatura, depresion y fiebre. Los signos principales primarios son: incremento en el pulso y nivel respiratorio, congestión de las membranas mucosas, anorexia, pelo hirsuto y disminución de la producción de leche .

Inicialmente la respiración es rapida, pero despues se observa una disnea severa que afecta la inspiración y expiración. Se ha observado en animales severamente afectados la respiración con el hocico abierto. La descarga nasal es severa al principio, pero cambia a mucosa y mucopurulenta segun progresa la enfermedad.

A la auscultación, los sonidos toracicos cambian de acuerdo al estadio de la enfermedad. Al principio se escucha un murmullo vesicular exagerado.

En la consolidación temprana, se escuchan ruidos crepitantes y crujiertes. Los sonidos bronquiales en una area extensa indican que hay una consolidación extensiva pero incompleta. La ausencia completa de sonidos indica la consolidación extensiva ó una pleuritis con efusión pleural, si la linea de demarcación es aguda y horizontal. Los sonidos de burbujeo o regurgitación estan asociados con moco en el arbol bronquial en estadios avanzados. Las neumonias cronicas estan caracterizadas por ruidos sonoros o silbantes debido a la presencia de moco fibrinoso. En la neumonia aguda los ruidos son más marcados en el tercio ventral del pecho, mientras que en las inflamaciones cronicas pueden ser escuchadas en toda el area pectoral. Los sonidos de fricción y golpeteos indican pleuritis.

En la percusión del pecho indican áreas de depresión, en donde existe consolidación. Puede haber dolor a la percusión en la neumonía extensiva. En la pleuritis la depresión es uniforme en la parte baja de los pulmones e indican la acumulación de fluido en la cavidad torácica (3, 24, 25, 28, 31, 36).

IDENTIFICACION DE LOS AGENTES PATOGENOS

En la neumonia de los bovinos existen diversos factores que influyen en la presentación de la enfermedad como ya se habia mencionado anteriormente, el estres, los mycoplasmas, virus y bacterias.

En este capitulo nos ocuparemos de describir las principales características de los agentes bacterianos patogenos capaces de ocasionar neumonia.

Las especies de microorganismos aislados mas frecuentemente en los casos de neumonia son los siguientes; Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica, Corynebacterium pyogenes, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Mycoplasma mycoides, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aureoginosa y Haemophilus somnus.

En la tabla No. 2 se presentan las principales características bioquímicas de las bacterias que causan neumonia en vacunos.

CARACTERISTICAS DEL GENERO PASTEURELLA

El genero Pasteurella consta de seis especies, sin embargo las más importantes son P. multocida y P. haemolytica por ser las más diseminadas y patogenas.

La Pasteurella multocida

Esta especie tiene algunos sinonimos P. septica, P. avicida y P. gallicida, es muy heterogena y tiene diferencias en patogenicidad, naturalidad serológica y en algunas características de cultivo, morfológicas y bioquímicas.

Tabla No. 2. Caracterización bioquímica de bacterias patógenas causantes de neumonías en bovinos (1, 2, 7, 10, 14, 17, 26, 33, 37).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------------|---|-----|-----|---|-----|---|---|---|
| Procesos de Gram | - | - | + | - | - | + | + | - |
| Catalasa | - | + | (+) | + | (-) | - | + | + |
| Oxidasa | + | + | (+) | - | (+) | - | - | + |
| H ₂ O ₂ | + | - | - | - | (+) | - | 0 | - |
| Indol | + | - | - | - | + | - | 0 | - |
| Ferrol de esofilo | - | - | 0 | - | 0 | 0 | 0 | - |
| Mogal. Escarlatina | - | - | - | + | 0 | - | + | - |
| Producción de Gas | - | - | - | + | - | 0 | 0 | + |
| Ornitina | + | + | - | + | - | 0 | 0 | - |
| Ureasa | - | - | - | - | - | 0 | + | + |
| Reducción Nitratos | + | + | - | + | + | - | + | + |
| Glucosa | + | + | + | + | + | 0 | + | + |
| Lactosa | - | + | + | + | + | + | + | - |
| Maltosa | + | + | + | + | 0 | + | + | - |
| Xilosa | + | + | + | + | + | 0 | - | - |
| Arabinosa | + | (+) | + | + | (+) | - | - | + |

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 1. <u>Pasteurella multocida</u> | 5. <u>Haemophilus somnus</u> |
| 2. <u>Pasteurella pseudolytica</u> | 6. <u>Streptococcus pyogenes</u> |
| 3. <u>Corynebacterium pyogenes</u> | 7. <u>Stachylococcus aureus</u> |
| 4. <u>Klebsiella pneumoniae</u> | 8. <u>Pseudomona aureuginosa</u> |

Simbolos. + = positivo - = negativo () = la mayoría de los casos

+ 6 -- 0 = datos no obtenidos

Esta especie se encuentra diseminada ampliamente en el tracto respiratorio de bovinos y ovinos.

Estas bacterias pueden ser agentes etiologicos primarios o secundarios. En muchas ocasiones esta relacionado con el complejo " Fiebre de embarque " y como invasor secundario despues del inicio de una neumonia viral. Como agente primario se ha encontrado en la enfermedad " septicemia hemorragica de bovinos, bison y bufalo de aguas " .

La P. multocida pertenece a los cocobacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, de 4 nm de ancho y 1.4 nm de largo. Despues de varios pasajes o subcultivos en condiciones desfavorables las colonias toman formas de abanicos. No forman esporas ni son moviles. La P. multocida de cultivos hechos de organos o cultivos recientes, se pueden teñir con azul de metileno o con la tincion de Giemsa, esto con el objetivo de observar como se tiñen fuertemente los polos de los cocobacilos, es decir, la tinción bipolar.

La P. multocida presenta colonias mucoides, lisas o rugosas. Las colonias mucoides crecen como colonias brillantes, pequeñas, con bordes irregulares, las colonias lisas son brillantes, pequeñas, tienen bordes irregulares y son de color gris o azulado. El brillo proviene de la substancia capsular.

La mayoria de los cultivos patogenos de P. multocida poseen capsulas grandes, las cuales estan formadas de carbohidratos y crecen a temperaturas de 22 a 42 grados centigrados. La temperatura optima de crecimiento es de 37 grados centigrados . El metabolismo de P. multocida es fermentativo; de los carbohidratos, se forma acido, pero no gas (1, 4, 9, 10, 20, 21, 29, 30).

La Pasteurella haemolytica.

La P. haemolytica pertenece a los bacilos coccoides u ovoideos, inmóviles de tinción bipolar y Gram negativos. Estas bacterias son generalmente mayores a las de P. multocida. Se puede comprobar la existencia de capsulas en cultivos de P. haemolytica patogena.

Estas bacterias crecen en agar gelosa sangre, en la cual los cultivos aislados recientemente causan una hemólisis, de donde se desprende el nombre de P. haemolytica. La propiedad hemolítica puede ser reducida o bien perderse en caso de cultivaciones repetidas. La temperatura optima de crecimiento es de 37 grados centigrados. El metabolismo de P. haemolytica es fermentativo y degrada un gran numero de carbohidratos (1, 3, 5, 21).

Pseudomona aureoginosa.

Los organismos del genero Pseudomona son aerobicos, no esporulados, Gram negativos y no fermentan la glucosa. Son catalasa positivos, desdoblán los azucars por oxidación; todos tienen flagelo polar exceptuando Pseudomona mallei.

La Pseudomona aureoginosa es un patogeno importante en animales, es comensal en membranas mucosas y se encuentra ampliamente diseminado en la naturaleza.

Patogenicidad. La P. aureoginosa es un patogeno oportunista muy frecuente. Debido a su resistencia relativa a las drogas, puede persistir en los procesos infecciosos en los cuales otros organismos más susceptibles son eliminados por el tratamiento. Se ha recuperado de lesiones neumonicas en bovinos, en casos de mastitis y en abscesos.

Características Principales.

La Ps. aureoginosa es un bacilo móvil de 0.5 a 0.8 μ m de ancho y de 1.5 a 3.0 μ m de largo. Se presenta en pares o cadenas con un flagelo polar. Ocasionalmente se presentan formas capsuladas y formas L en algunas cepas. Crecen en medios de cultivo sencillos y causan hemólisis en agar sangre. Las formas coloniales son muy variadas. Junto con las colonias planas, brillantes con bordes irregulares se encuentran colonias rugosas y mucosas. La Ps. aureoginosa crece optimamente a 37 grados centígrados, no requiere de factores de crecimiento y es capaz de formar ácido de d-arabinosa, l-arabinosa, d-glucosa, d-galactosa, d-manoza y d-xilosa. Las reacciones de Voges Proskauer y de rojo de metilo son negativas, no se produce indol y la reacción citocromooxidasa es positiva. Las bacterias producen arginindehidrolasa, pero no ornitina y lisindescarboxilasas. La Ps. aureoginosa produce 8 pigmentos, piocianina, fluorescencia, oxifenacina, proteína azul de Pseudomona, piocianina, clororafina, Feracina ac. carbonico, heterocianina.

Desde hace tiempo se conoce que algunas cepas de Ps. aureoginosa producen una substancia bactericida la que se conoce como piocianasa y tiene características lipoides. El efecto bactericida de la piocianasa es activa contra varios tipos diferentes de enzimas.

El olor aromático de los cultivos de Ps. aureoginosa, es atribuido a la α -aminoautoferona y puede ser medido para una valoración diagnóstica. En un caso normal el reconocimiento de Ps. aureoginosa se puede hacer en base del olor típico, las formas típicas coloniales, la formación de hemólisis en agar sangre y por la piocianasa.

En cepas que no producen el pigmento piocimina, se necesitan hacer pruebas complementarias. De estos uno de los principales criterios es la reacción positiva de la citocromooxidasa, la fermentación aerobia de glucosa, así como la oxidación de gluconato de potasio a 2-cetogluconato y el crecimiento de las colonias a 42 grados C (5, 6, 22, 25, 31).

Micoplasmas.

Los micoplasmas miembros de la clase Mollicutes orden micoplasma-
tales son los organismos vivientes libres mas pequeños. A diferencia de las bacterias no tienen pared celular, pero estan rodeados de una membrana. Esto explica el notable pleomorfismo. En frotis teñidos se observan como anillos, globulos cocobacilos pequeños o filamentosos. Si bien las colonias con forma de "huevo frito" son características y un alto porcentaje crecen como colonias aberrantes en el aislamiento primario.

La clase Mollicutes contiene mas de 14 patogenos en humanos y animales, en los cuales se incluye a la pleuropneumonia contagiosa bovina (M. mycoides subespecie mycoides).

Los micoplasmas son en su mayoría especificos de especie, pero M. bovis por ejemplo, que causa una variedad de lesiones en bovinos ha sido aislado de pulmones neumonicos de borregos y de humanos con enfermedad respiratoria. La mayoría de los aislamientos de bovinos pueden ser clasificadas con procedimientos serológicos y se han identificado ocho grupos.

Enfermedades causadas en bovinos.

La pleuroneumonía bovina es una enfermedad contagiosa que produce consolidación pulmonar y derrame pleural que ocasionalmente causa la muerte, parece que los microorganismos se propagan por el aire. Los micoplasmas se encuentran en el exudado inflamatorio.

Se han observado también artritis y mastitis como signos clínicos de la micoplasmosis bovina y se ha asociado con aborto, conjuntivitis, salpingitis, vesiculitis seminal y vaginitis. Los micoplasmas (M. dispar y M. bovis) pueden causar infecciones subclínicas y junto con bacterias o virus varias enfermedades clínicas.

Características principales de los micoplasmas.

Los micoplasmas son las unidades reproductivas más pequeñas, tienen un tamaño de 125 - 250 nm, son pleomórficos debido a la carencia de una pared celular, en lugar de esta contienen una membrana unitaria de tres capas. Son resistentes a la penicilina, pero se inhiben por la acción de la tetraciclina o eritromicina. Se reproducen en medios exentos de células; en agar se reproducen abajo de la superficie con colonias características y su crecimiento se inhibe por anticuerpos específicos.

Cultivo de micoplasmas

Muchas cepas de micoplasmas crecen en caldo peptonado de infusión de corazón con 2 % de agar (pH 7.8) al cual se agrega un 30 % de suero sanguíneo (de caballo o conejo). Después de 2 a 6 días de incubación se pueden observar con una lupa colonias aisladas que miden de 20 a 500 μ m .

Los microorganismos pueden ser teñidos, para estudios microscópicos, colocando un cuadro de agar, que contenga varias colonias, sobre un portaobjetos y cubriendo la colonia con un portaobjetos en el cual se ha dejado evaporar previamente una solución alcohólica de azúcar y azul de metileno (8, 11, 14, 16).

En la tabla 3 se describen las características principales de 2 especies de Micoplasmas.

Tabla 3. Características bioquímicas de los Micoplasmas mycoides y bovis.

| MICOPLASMA | Digitonina | Glucosa | Arginina | Urea | Fosfatasa | Digestion Serica |
|----------------|------------|---------|----------|------|-----------|---------------------|
| M. mycoides | S | + | - | - | - | - |
| Subs. mycoides | | | | | | |
| M. bovis | S | - | - | - | + | - |

S= Sensible

Klebsiella pneumoniae.

El genero Klebsiella esta ampliamente distribuido en animales de sangre caliente, algunas veces como parte de la flora normal del tracto respiratorio y de la piel, y en otras como agente patogeno de neumonias, enteritis, mastitis, infecciones genitales o septicemia. Las enfermedades causadas por Klebsiella ocasionan graves perdidas economicas, sobre todo en animales jovenes y en vacas productoras de leche (11) .

Características Morfológicas y de Cultivo.

La Klebsiella pertenece a los bacilos Gram negativos, no esporulados, inmóviles, capsulados, miden de 0.6 - 6 mm de largo y de 0,3 a 1.5 mm de ancho. En frotis se observan bacterias sencillas, dobles o en cadenas. Se observa tambien una capsula, pero en medios de cultivo aislados de animales o humanos, despues de repetidos subcultivos en medios artificiales, algunas cepas pierden sus capsulas, sin embargo otras las conservan durante años.

Un gran numero de Klebsiella son capaces de formar una fimbria. Tal igual que otras especies de la familia Enterobacteriaceae utilizan estas fimbrias para adherirse a la superficie celular y por ello se consideran como un factor de virulencia.

La Klebsiella se caracteriza por un crecimiento rapido en medios de cultivo simples y se observan colonias grandes, mucosas y convexas. Las colonias mucosas se caracterizan por la formacion de capsulas.

En casos raros se presentan colonias lisas que son formadas por bacterias sin capsulas y que son llamadas como formas S.

La temperatura de crecimiento esta entre 12 y 43 grados C. y el optimo es de 35 - 37 grados C. con un pH de 7.2 . .

Bajo el efecto de determinados antibioticos (penicilina, cefalosporinas) en medios de cultivo de Klebsiella se presentan, en una parte de las colonias, las formas L (37) .

Propiedades Bioquimicas.

El genero Klebsiella pertenece a la familia Enterobacteriaceae esto es debido a sus características morfologicas y bioquimicas, como la degradacion de nitratos y nitritos, la fermentacion de glucosa y la reaccion negativa de citocromocidasa.

La Klebsiella pneumoniae puede ser dividida en diferentes biotipos, esto es debido a una gran variabilidad en las reacciones bioquimicas (4, 13, 22, 37) .

Ademas de la identificacion bioquimica de K. pneumoniae existe la posibilidad de una tipificacion por medio de bacteriofagos.

Esto se ha llevado a cabo con la ayuda de la lisotipia y un sistema de tipificacion con 14 diferentes bacteriofagos.

Resistencia a Antibioticos. Originalmente se observo una gran sensibilidad "in vitro" de los cultivos de Klebsiella a los antibioticos y sulfonamidas. Pero actualmente debido a la aplicacion masiva de estas sustancias como medicos terapeuticos y profilacticos en las explotaciones animales se ha desarrollado una gran resistencia a antibioticos y sulfas.

Esto tambien es debido a que dentro de las Enterobacteriaceae, la mayoria de sus miembros poseen plasmidos-R extracromosomales que contienen propiedades de resistencia , las cuales pueden ser transmitidas por medio de los pili a otros generos (10, 13).

Haemophilus somnus *.

El genero Haemophilus consiste de cocobacilos o bacilos pequeños inmóviles, anaerobios facultativos, Gram negativos, los cuales requieren de uno a dos factores de crecimiento. Estos factores son llamados X y V, El factor X o hemina es un complejo de protoporfirinas y una parte esencial del sistema bacteriano respiratorio (Citocromo, citocromooxidasa, catalasa y peroxidasa), este es comparable con los sistemas hemoglobina y clorofila.

El factor V nicotinamida adenina nucleotido (NAD) toma parte activa en los procesos de oxidoreducción de la célula en crecimiento. Estas sustancias termolábiles están ampliamente diseminadas en células de plantas y animales y en algunos microorganismos son producidas con exceso, por ejemplo, estafilococos, micrococos y Pseudomonas.

Las especies reconocidas de Haemophilus reducen los nitratos a nitritos, fermentan glucosa y otros carbohidratos. Las pruebas fermentativas son difíciles de llevar a cabo debido a las características especiales de crecimiento y con un medio adecuado se realizan las pruebas de sacarosa, lactosa, manitol, xilosa y desoxirribosa. La prueba de la actividad de oxidasa depende de las condiciones de cultivo y muchas ocasiones no da resultados claros.

Factores de Virulencia.

El factor de virulencia más activo en el genero Haemophilus es la capsula. Como con los Pneumococos y la Klebsiella el carácter hidrofobo de la superficie bacteriana representa un impedimento para la adsorción del agente a la superficie de los fagocitos.

* Actualmente este microorganismo es conocido como Actinobacillus.

Como agente Gram negativo el Haemophilus produce una endotoxina que tiene un efecto letal en conejos. Diferentes cepas de humano y animal producen enzimas tales como la hialuronidasa y la neuraminidasa .

El H. scanus causa problemas respiratorios en bovinos e infección genital. también ocasiona septicemia con meningoencefalitis y una enfermedad algunas veces llamada meningoencefalitis tromboembólica (12, 30, 35) .

Sensibilidad a los Antibióticos.

Las pruebas "in vitro" para determinar la sensibilidad de Haemophilus a agentes quimioterapéuticos son difíciles de estandarizar debido a los requerimientos complejos de cultivo de estas bacterias, por ello existen muy diversas opiniones respecto a este tema.

Las bacterias del género Haemophilus son generalmente sensibles a las beta-lactaminas (penicilina y ampicilina), tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglucosidas (estreptomycinas, neomicina), nitrofuranos, pepto-antibióticos (Polimixina B, colistina) , sulfonamidas y co-trimoxazol.

Una menor sensibilidad se presenta contra bacitracina, cloxacilina y cefalosporinas (32).

El grado de sensibilidad puede variar de acuerdo con la especie. Para H. influenzae la ampicilina representa el antibiótico de elección. H. pleuropneumoniae es especialmente sensible a penicilina, tianfenicol, novobiocina y sulfonamidas (27, 31, 32).

Staphylococcus aureus.

Los estafilococos son células aerobias y anaerobias facultativas. Gram positivas, esféricas, catalasa positiva, inmóviles fermentativas. En muchas ocasiones se agrupan en racimos irregulares y en pares. Crecen con facilidad en diversos medios de cultivo y son muy activos en su metabolismo, producen pigmentos que van del blanco al amarillo intenso. En ocasiones son comensales en la piel en membranas mucosas en el hombre y en animales.

Los estafilococos patógenos son generalmente hemolíticos y coagulan el plasma, causando diferentes enfermedades, pueden provocar supuraciones, abscesos y septicemias mortales. Pueden desarrollar rápidamente resistencia a diversos agentes microbianos.

El Staphylococcus aureus es coagulasa positivo, beta hemolítico, fermenta maltosa y manitol. Para facilitar su identificación las cepas de *S. aureus* deben producir coagulasa. La capacidad de producir esta enzima puede ser débil en ocasiones.

Para su aislamiento a partir de muestras sospechosas, se puede inocular en agar con sangre de bovino o de ovino en infusión corazón-cerebro ó en el medio de tioglicolato. El crecimiento en los medios semisólidos o líquidos se examina para comprobar la presencia de cocos. Su crecimiento es más rápido a 37 grados C, pero forman mejor su pigmento a temperatura ambiente, el pigmento de *S. aureus* es amarillo dorado intenso. Las colonias son redondas brillantes, convexas, lisas y opacas. La mayoría de cepas producen beta-hemólisis y frecuentemente es aparente una zona doble de hemólisis en la cual la zona clara central está rodeada por una banda de hemólisis parcial. Las colonias pueden poseer pigmentación blanca, dorada o verdosa.

Los estafilococos contienen tanto, pigmento, polisacáridos, como, proteínas antigénicas, que permiten hasta cierto punto un agrupamiento de las cepas. Los ácidos teicoicos eslabonados al péptido glucano de la pared celular pueden ser antigénicos. Las proteínas superficiales pueden interferir con la fagocitosis. La proteína A, un componente de la pared celular, es capaz de ligarse a la porción Fc de cualquier molécula de IgG. Esto hace que la porción F a b de cualquier molécula de anticuerpo este hacia afuera.

La mayoría de las sustancias extracelulares producidas por estafilococos son igualmente antigénicas, entre estas tenemos a las siguientes: Exotoxina, esta es una sustancia filtrable termolabil, letal para animales de laboratorio y contiene diversas hemolisinas solubles que pueden ser separadas por electroforesis. La exotoxina tratada con formaldehído es un toxoide atóxico, pero antigénico que se ha utilizado para estimular la inmunidad antitóxica contra los estafilococos.

Leucocidinas: Es un material soluble que lisa leucocitos de diversas especies animales, es antigénica y más termolabil que la exotoxina. Los anticuerpos contra la leucodina pueden desempeñar un papel importante en la resistencia a infecciones estafilococcicas recurrentes.

Enterotoxinas: Es producida por algunas cepas de estafilococos, es una proteína termoc estable que resiste la ebullición por 30 minutos y la acción de las enzimas intestinales. La ingestión de 25 mg de enterotoxina B resulta en vómito y diarrea en el humano o en los monos.

Coagulasa: La mayoría de los estafilococos patógenos producen esta sustancia proteica que se comporta como una enzima y coagula el plasma oxalatoado o citratoado en presencia de un factor contenido en muchos sueros.

Existen otras sustancias extracelulares producidas por estafilococos: Una hialuronidasa o factor de propagación, una estafilocinasa, proteinasa, lipasas, penicilinas y una toxina exfoliativa.

Respecto a la sensibilidad a quimioterapia, los estafilococos presentan mucha variación; se encuentran cepas mutantes que son resistentes a una gran cantidad de sulfonamidas y antibióticos. Muchas otras cepas son resistentes a antibióticos por medio de plásmidos que pueden ser transferidos por bacteriófagos (7, 11, 27, 35).

Streptococcus pyogenes

Los estreptococos son microorganismos esféricos, que se caracterizan por su capacidad para producir cadenas de cocos de una longitud variable y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunos son miembros de la flora normal del hombre, en tanto otros están asociados a importantes enfermedades, la categoría piogénica contiene a la mayoría de cepas productoras de enfermedades en el hombre y en animales.

El Str. pyogenes es el agente causal de mastitis en bovinos y problemas neumónicos, además de otras infecciones. En humanos es causante de diversos procesos infecciosos. Para el aislamiento de estas bacterias se puede utilizar el agar sangre, el medio líquido infusión corazón-cerebro ó un medio selectivo para estreptococos.

Sus colonias son pequeñas, discoidales que miden de 1 a 2 milímetros de diámetro. Las bacterias individuales son cocos esféricos ó ovoides Gram positivos y crecen a temperaturas entre 15 y 45 grados C, siendo la óptima de 37 grados C. La energía es obtenida fundamentalmente de la utilización de carbohidratos.

El crecimiento de los microorganismos tiende a ser pobre tanto en medios sólidos como en caldo, a menos que se les enriquezca con sangre o diversos líquidos tisulares. Las variantes de una misma cepa de estreptococos pueden dar lugar a colonias con diferencias morfológicas; esto es muy marcado entre las cepas de Str. pyogenes, las células pueden dar lugar a colonias mates y colonias lustrosas.

Las colonias mates están formadas por microorganismos que elaboran mucha proteína M; tales organismos tienden a ser virulentos y a ser relativamente poco susceptibles a la fagocitosis de los leucocitos humanos. Las colonias lustrosas tienden a producir poca proteína M y a menudo son avirulentas. (4, 5, 8, 16).

Corynebacterium pyogenes.

Los miembros de este género son cocos Gram positivos, pequeños, pleomórficos y no forman esporas. Son aerobios ó anaerobios facultativos, forman ácido, pero no gas a partir de carbohidratos, miden de 0.5 a 1 micra de diámetro. Presentan dilataciones irregulares características en uno de sus polos y se pueden teñir con la tinción metacromática. Algunas Corynebacterias son microorganismos comensales en la piel o membranas mucosas de animales.

El Corynebacterium pyogenes puede causar neumonía supurativa en bovinos, infecciones de heridas, poliartritis, mastitis supurativas y abortos en bovinos.

Los frotis de pus teñidos con la tinción de Gram indican la presencia de Corynebacterias, pero puede haber confusión con estreptococos, estafilococos y Listeria.

C. pyogenes crece en agar sangre a 37 grados C, en incubación aeróbica, a las 48 horas aparecen colonias pequeñas y beta hemolíticas.

Ha sido demostrado que la composición de la pared celular de C. pyogenes era diferente a la de las otras Corynebacterias y que era muy semejante a la de los estreptococos.

En el caso de aislamiento de las colonias a partir de sangre, secreciones o material orgánico, se pueden utilizar medios de cultivo comunes sin adición de suero o sangre : Se pueden mejorar los medios de cultivo agregando sangre defibrinada de ovino en concentración del 5 al 10 % . En esta clase de medio se observa alrededor de las colonias una hemólisis. (4, 8, 27, 30, 31).

2.-JUSTIFICACION

Debido a la elevada frecuencia de presentación de neumonias en bovinos y a la perdida socioeconomica que representa la muerte de animales ó su tratamiento. Se considera importante realizar investigaciones tendientes a conocer más a fondo la etiologia, que se presenta en la zona occidente de nuestro pais. Conociendo las bacterias que causan la enfermedad y su patogenicidad se pueden planear mas facilmente campañas tendientes a controlar este problema infeccioso.

3.- HIPOTESIS.

Las neumonías de bovinos son causados por agentes bacterianos principalmente Pasteurella, Corynebacterium y Klebsiella entre otras. Entonces para comprobar la presencia de microorganismos patógenos se deben aislar éstos de pulmones neumónicos e identificar plenamente a través de pruebas bioquímicas y morfológicas.

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La elevada frecuencia de problemas neumonicos en bovinos causa actualmente varios problemas economicos, con repercusiones graves para la industria ganadera del Pais.

Debido a que no existen suficientes estudios en nuestro Pais en los que se hayan aislado e identificado bacterias patogenas que causan la neumonia en el ganado vacuno se realizara el presente trabajo de investigacion.

Su finalidad es la de determinar la presencia de bacterias patogenas en pulmones neumonicos de bovinos sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara Jalisco.

5.- OBJETIVOS.

- 1.- Aislar bacterias patógenas de muestras de pulmones neumónicos y conocer la frecuencia con la que se presentan estos microorganismos en las neumonías del ganado bovino de la zona occidental del país.
- 2.- Identificar mediante pruebas bioquímicas y morfológicas a las bacterias patógenas que se encuentran en pulmones neumónicos.
- 3.- Determinar la patogenicidad de las bacterias mediante la reproducción de la enfermedad en animales de laboratorio.

6.- MATERIAL Y METODOS

OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Para aislar las bacterias patogenas que se encuentran en los pulmones neumonicos, se tomaron un total de 150 muestras al azar de pulmones de bovinos con problemas neumonicos sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara Jalisco.

En el interior del rastro municipal de Guadalajara, en el area de bovinos, se tomaron las muestras utilizando guantes, pinzas, tijeras y cuchillo. Cuando se sacrificaban los bovinos y se abrian se observaron uno por uno los pulmones y de todos aquellos con problemas neumonicos, se tomaba una muestra con pinzas y se cortaba con tijeras ó cuchillo previamente esteriles con una solución de benzal al 10 %. El tamaño del corvo de la muestra fue de 6 a 2 cm aproximadamente y se colocaron en frascos esteriles con tapa y se guardaron en una caja de hielo seco para su transportación (34).

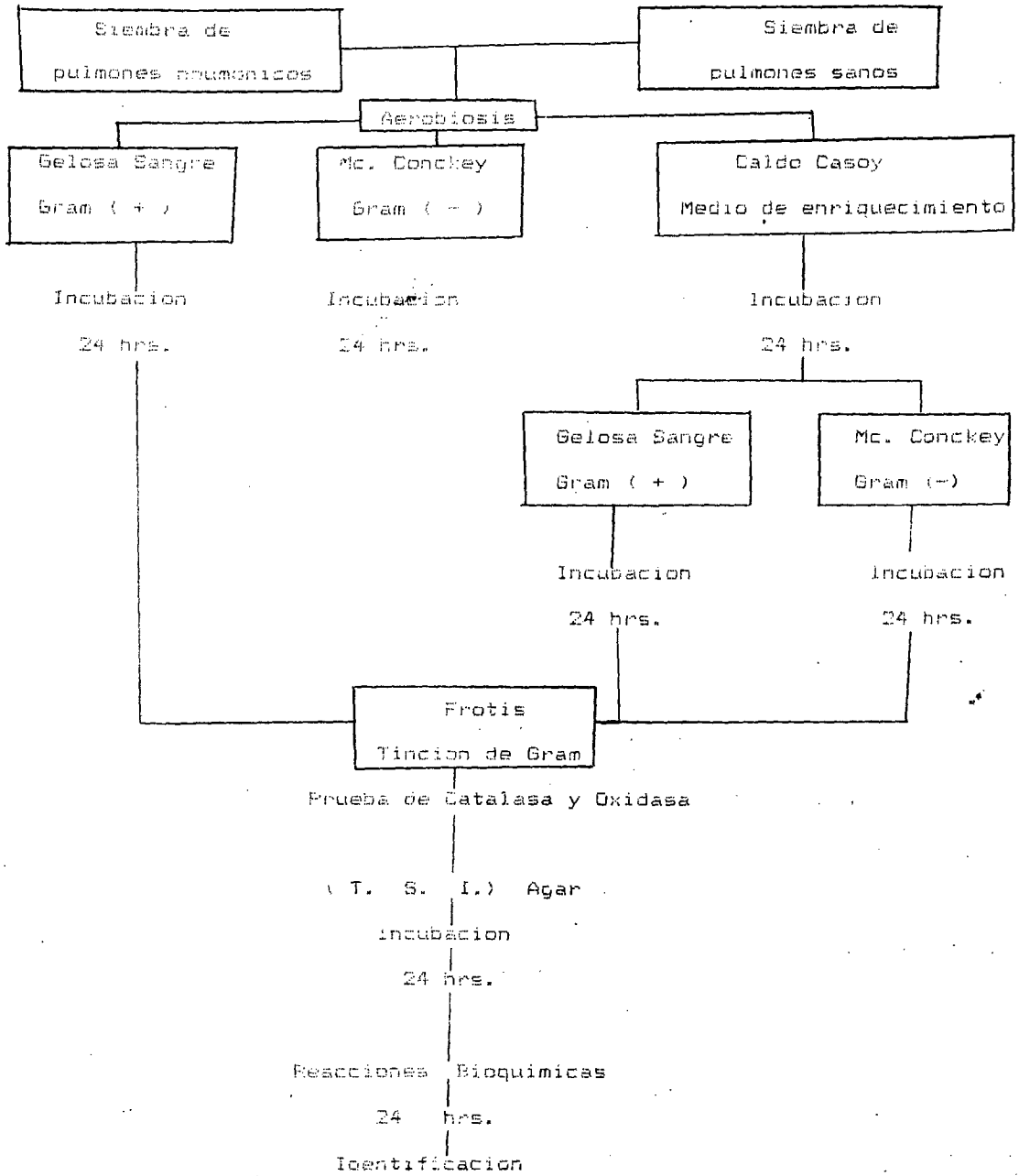
Ademas se tomaron 50 muestras de pulmones aparentemente normales como control, con el mismo procedimiento utilizado para la toma de muestras de pulmones neumonicos.

Procesamiento de las Muestras.

Una vez tomadas las muestras y empacadas, fueron transportadas al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara para su procesamiento.

La identificación bioquímica y aislamiento de las bacterias fue realizada mediante las técnicas descritas en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, el Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica y Manual of Clinical Microbiology (7, 27,35).

ESQUEMA METODOLÓGICO GENERAL



Para el crecimiento de microorganismos dentro del laboratorio se utilizaron medios de cultivos simples tales como; El Agar Gelosa Sangre, que es un medio de cultivo general tanto para bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas. El Agar Mc. Conkey que es un medio específico para bacterias Gram negativas y Caldo Casoy, como medio de enriquecimiento de los microorganismos.

Al llegar las muestras al laboratorio, estas, se trabajaron aproximadamente en un lapso de 2 a 4 horas posteriores a su recolección. Cada muestra se puso en una charola previamente esteril con fenol al 5 % y con una espátula al rojo vivo cauterizo la zona donde con unas tijeras se abrió la muestra para tomar con una aza de platino el exudado y sembrarlo en los medios de cultivo.

Medios de aislamiento.

Los medios de cultivo que se sembraron por estrias fueron el Agar Gelosa Sangre y el Agar Mc. Conkey en caja. Además se cortó con las tijeras un pedazo de pulmón y con las pinzas se introdujo en un tubo que contenía medio de cultivo líquido (caldo soya tripticosa). Todo esto en un ambiente esteril. Una vez sembrados los medios de cultivo se incubaron a 37 grados centígrados por 24 horas, después se observó la morfología macroscópica de las colonias bacterianas (cantidad de colonias, consistencia, forma, tamaño de las colonias, su color y olor).

Tinción de Gram.

De cada colonia diferente, se tomó una parte con el aza de platino y se hizo un frotis en un portaobjeto para hacer la tinción de Gram, con el fin de observar la morfología de las bacterias (forma de la bacteria, tamaño y si eran bacterias Gram positivas o Gram negativas).

Prueba de Catalasa

Con el aza se tomo una parte de la colonia y se extendio en un papel filtro, el cual se sumergio en peroxido de hidrogeno al 3 %, cuando existia catalasa, la produccion de gas condujo rapidamente los discos hacia la superficie.

Prueba de Oxidasa.

Para esta prueba se tomo una parte de la colonia y se impregno en papel filtro y se le añadio a este un reactivo (Tetrametil-p-fenilendiamina dihidroclorhidrica). Para leer la reaccion esperamos 30 segundos, cuando toma un color azul intenso la reaccion es positiva a la oxidasa y cuando toma un color amarillento se dice que es oxidasa negativa.

Aislamiento Final y Conservación de los Cultivos.

El Agar soya tripticasa (A S T) es un medio en tubo de superficie inclinada, el cual se siembra en la superficie del medio por estrias. Una vez que los cultivos fueron aislados en los medios anteriormente mencionados, se inocularon en (AST) y fueron incubados 24 hrs. a 37 grados centigrados. Posteriormente se rotulo cada uno de los tubos y se guardaron en refrigeración, para poder ser utilizados en las pruebas bioquimicas.

Identificación bioquimica.

La identificación bioquimica fue hecha a cada uno de los cultivos bacterianos que se aislaron en los medios de cultivo (AST) . Con el fin de identificar a las bacterias que se encontraron en los pulmones neumonicos, así como tambien de pulmones sanos.

Estas pruebas tambien nos ayudaron a diferenciar bacterias de la misma familia. Ejemplo Enterobacteriaceae, donde tenemos a las Klebsiella, Escherichia, Salmonella, etc.

Pruebas de Movilidad, Indol y Ornitina.

Estas pruebas fueron realizadas en el medio M I O (Bioxon), este es un medio de cultivo semisolido. Tomamos una parte de las colonias que fueron aisladas en los medios de cultivo (AST) con el asa de platino de punta recta y la sembramos por picadura, se cerro el tubo y se puso a incubación a 37 grados centigrados por 24 horas. Posteriormente se observo en el medio de cultivo, una turbidez del medio, nos indico movilidad positiva, y la coloración amarilla del medio indico ornitina negativa.

Para observar el indol se agregaron 4 gotas del reactivo de Kovack al medio y una coloración amarilla al contacto con el reactivo es negativa y cuando toma un color rojo se dice que es indol positivo.

Pruebas de Rojo de Metilo y Voges Proskauer.

El medio Rm-Vp (Bioxon) es un medio liquido y se siembra introduciendo el asa cargada con el inculo. Esta prueba bioquimica se empleo para diferenciar diversos microorganismos coliformes. Despues de 24 horas de incubacion a 37 grados centigrados se dividió el medio en dos partes. A una parte se le agregaron 6 gotas de rojo de metilo, si observamos a los 30 minutos una reacción acida, como en el caso de E. coli, es positiva. Por otra parte la Klebsiella aerogenes descarboxila y condensa el ácido piruvico para formar acetilmetilcarbinol y cuando se agrega el rojo de metilo al medio el color es amarillo, es decir, Rm negativo.

A la otra parte del cultivo se le agregaron 0.2 ml. de KOH al 40 % y 0.6 ml. de Alfa naftol, si a los 30 minutos observamos un anillo rojo es Vp positivo y cuando el color no cambia es Vp negativo.

Pruebas de Acido sulfídrico, producción de gas, lactosa y glucosa.

El (TSI) es un medio solido en tubo de superficie inclinada, éste medio fue inoculado dos veces, una con el aza de punta redonda y la otra con el aza de punta recta. A las 24 horas de incubación se observa si la bacteria produce acido sulfídrico, esto es cuando el medio toma una coloración negra, si el medio se separa en partes la bacteria produce gas. Este medio tambien muestra si la bacteria fermenta la lactosa o la glucosa, cuando el medio se torna rojo la bacteria fermenta la lactosa y / o glucosa.

Citrato.

Es un medio solido en tubo de superficie inclinada. Este medio se utilizo para observar a las bacterias que utilizan el carbono para su crecimiento. A las 24 horas de incubación una coloración azul es citrato positivo.

Prueba de Patogenicidad.

La prueba se hizo en 50 ratones adultos de ambos sexos, obtenidos de la Unidad de Investigaciones Biomedicas de Occidente, criados en condiciones normales y aparentemente sanos. Se utilizaron 10 cepas que fueron aisladas en pulmones aparentemente normales y 30 cepas que se aislaron e identificaron de pulmones neumonicos del ganado bovino. Las cepas bacterianas se cultivaron durante 24 horas en caldo soya tripti- casea y tras una centrifugación a 3000g durante 30 minutos, se resuspen- dieron en NaCl al 0.25 % . Cada raton fue inoculado peritonealmente con 0.1 ml. de la suspensión bacteriana. Se utilizo una cepa para cada dos ratones y una vez inoculados se aislaron de los demas. Con una jaula para dos ratones, alimentados con una dieta balanceada convencio- nal y agua ad libitum observando su estado de salud dos veces al dia por siete dias.

A los ratones que morian entre este periodo de tiempo se les hizo necropsia tomando dos muestras de cada raton muerto; una del liquido peritoneal y otra de la sangre del corazón. Las muestras se sembraron en medios de cultivos (Agar Gelosa Sangre y Agar Mc. Conkey) y se in- cubaron a 37 grados centigrados por 24 horas. Posteriormente se hi- zo la tinción de Gram, prueba de catalasa, prueba de oxidasa y pruebas bioquimicas para reidentificar las bacterias patogenas que causaron la muerte a los ratones en experimentacion .

Determinación de las Unidades Formadoras de Colonias.

Para obtener las Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.), las bacterias aisladas e identificadas, fueron resembradas en caldo caso y se incubaron a 37 grados centigrados por 24 horas, posteriormente, se tomo con una pipeta esteril un mililitro del medio de enriquecimiento y se puso en un tubo de ensayo que contenia 9 ml. de solución salina fisiologica esteril (S.S.F.E.) para obtener una dilución de 1:10, con esta dilución se hicieron otras para obtener diluciones, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000. Esta ultima se homogenizo perfectamente y se tomo con una pipeta esteril graduada 0.1 ml. y posteriormente se sembro en un medio solido, Agar Mc. Conkey en caja, extendiendose la dilución por toda la superficie del medio de cultivo, una vez sembrados los medios de cultivo se incubaron a 37 grados centigrados por 24 horas. Enseguida se hizo un conteo en el fotometro de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo para obtener las Unidades Formadoras de Colonias (U. F. C.), representandolas en forma logaritmica.

7.- RESULTADOS

Aislamiento de bacterias de pulmones neumonicos del ganado bovino. Se trabajaron 150 muestras de pulmones neumonicos, de los cuales fueron aisladas 194 cepas. Las tablas No. 4 y 5 nos muestran un resumen de los resultados.

Tabla No. 4. Frecuencias de las especies aisladas a partir de pulmones neumonicos.

| | No. de cultivos aislados | Porcentajes* |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------|
| <u>Escherichia haemolytica</u> | 46 | 24 |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | 33 | 17 |
| <u>Corynebacterium spp</u> | 27 | 13 |
| <u>Pseudomonas bronchiseptica</u> | 25 | 12 |
| <u>Listeria monocytogenes</u> | 18 | 9 |
| <u>Klebsiella spp</u> | 9 | 5 |
| <u>Streptococcus spp</u> | 7 | 4 |
| <u>Pseudomonas spp</u> | 5 | 2.5 |
| <u>E. coli</u> | 5 | 2.5 |
| <u>Salmonella spp</u> | 4 | 2 |
| <u>Cultivos no identificados</u> | 15 | 8 |
| Total | 194 | 100 % |

* Con referencia a los 194 aislamientos.

Tabla No. 5. Identificación bioquímica y morfológica de las bacterias aisladas de pulmones neumonocó de bovinos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

| Depos | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|-----------------------|---|----|----|---|----|----|----|----|---|---|
| No. de veces aisladas | 8 | 46 | 27 | 9 | 7 | 33 | 5 | 25 | 5 | 4 |
| Pruebas de Gram | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Catalasa | + | ++ | ++ | + | - | + | + | + | + | + |
| Oxidasa | + | + | ++ | - | - | - | - | - | + | - |
| Movilidad | - | - | - | - | +- | - | - | + | - | + |
| Acido sulfídrico | + | - | - | - | - | ++ | - | ++ | - | + |
| Indol | + | - | - | - | - | ++ | + | - | - | - |
| Rojos de Nébilo | - | - | ++ | - | - | + | +- | - | - | + |
| Voges Proskauer | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - |
| Producción de Gas | - | - | - | + | + | ++ | - | ++ | + | - |
| Citrato | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Reducción de Nitratos | + | + | - | + | - | + | - | - | + | - |
| Ureasa | - | - | - | + | +- | + | - | + | + | - |
| Glucosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactosa | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Maltosa | + | + | + | + | + | + | + | +- | - | + |
| Xilosa | + | + | + | + | +- | + | + | + | - | + |
| Arabinosa | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - |

A= Pasteurella multocida

B= Pasteurella haemolytica

C= Corynebacterium spp

D= Klebsiella spp

E= Streptococcus spp

F= Staphylococcus aureus

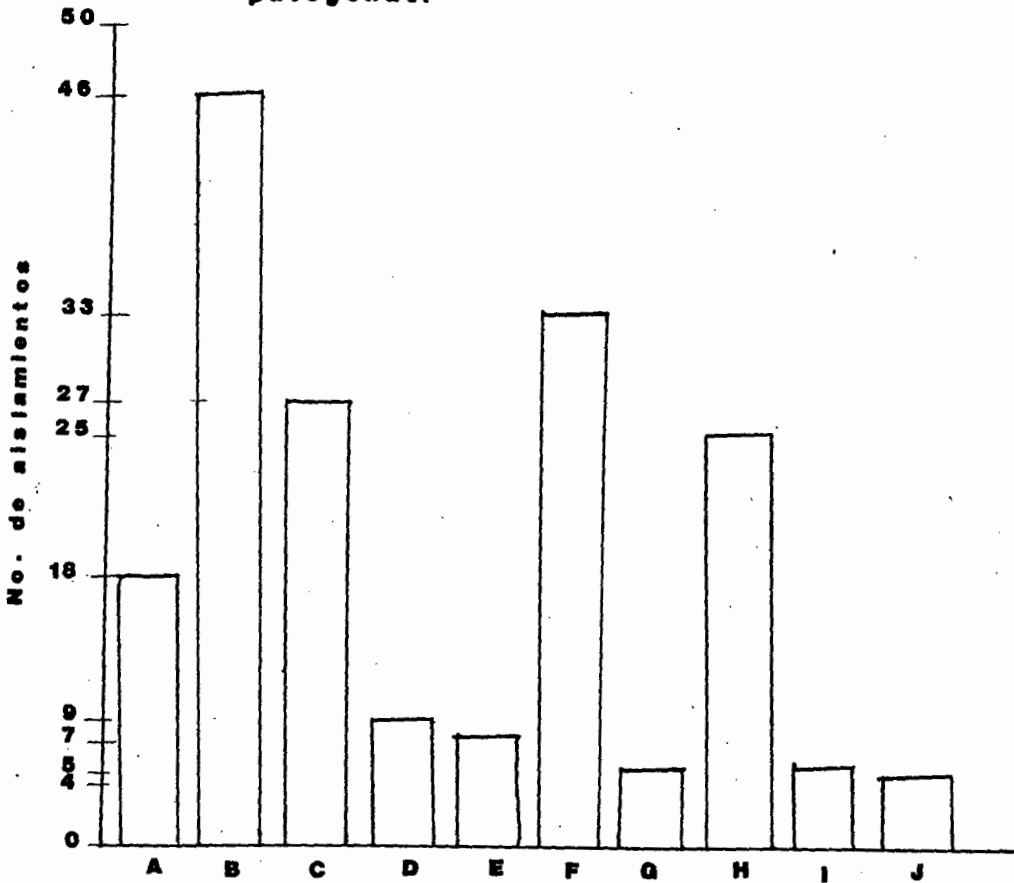
G= E. coli

H= Bordetella bronchiseptica

I= Pseudomona spp

J= Salmonella spp

Figura No.1 Frecuencia del aislamiento de bacterias patogenas.



A: P.multocida

B: P.haemolytica

C: Corynebacterium spp

D: Klebsiella spp.

E: Streptococcus spp

F: S. aureus

G: E.coli

H: B. bronchiseptica

I: Pseudomona spp

J: Salmonella spp

Aislamiento de bacterias de pulmones aparentemente sanos del ganado bovino.

De las 30 muestras que se trabajaron de pulmones aparentemente normales, 21 resultaron libres de microorganismos por no desarrollar ninguna colonia en los diferentes medios de cultivo utilizados, de las 29 muestras restantes se obtuvieron diferentes cultivos de microorganismos, lo cual se resume y esquematiza en la tabla No. 6 y 7 y en la figura No. 2.

Tabla No. 1. Identificación bioquímica de las bacterias aisladas de pulmones aparentemente sanos de bovinos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

| Cepas | A | B | C | D | E | F | G |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| No. de veces aisladas | 2 | 9 | 5 | 1 | 4 | 7 | 1 |
| Prueba de Gram | - | - | + | - | + | + | - |
| Catalasa | + | + | + | + | - | + | + |
| Oxidasa | - | + | + | - | - | - | + |
| Movilidad | - | - | - | - | + | - | + |
| Acido sulfídrico | + | - | - | - | - | - | + |
| Indol | + | - | - | - | - | + | - |
| Reacción Nitilo | - | - | - | - | - | + | - |
| Voges Proskauer | - | - | - | + | - | + | - |
| Producción de Gas | - | - | - | + | + | - | + |
| Citrato | + | + | + | + | + | + | + |
| Reducción de Nitratos | + | + | - | + | - | + | + |
| Ureasa | - | - | - | + | + | + | + |
| Glucosa | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactosa | - | + | + | + | + | + | + |
| Maltosa | + | + | + | + | + | + | + |
| Xilosa | + | + | + | + | + | + | + |
| Arabinosa | + | + | + | + | - | - | + |

A= Pasteurella multocida

B= Pasteurella haemolytica

C= Corynebacterium spp

D= Klebsiella spp

E= Staphylococcus aureus

F= Bordetella bronchiseptica

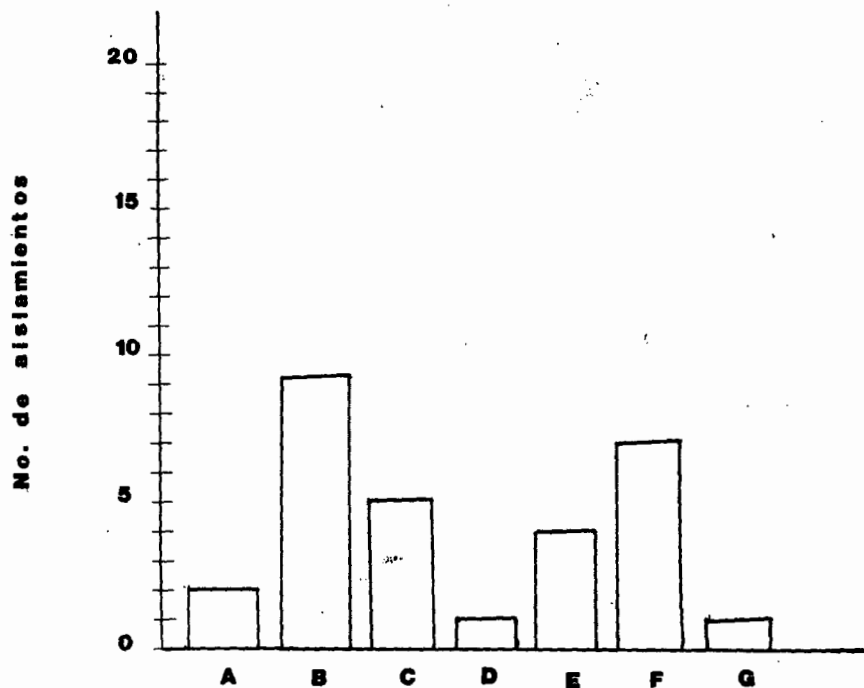
G= Pseudomona spp

Tabla No. 7 Aislamientos bacterianos a partir de pulmones aparentemente normales.

| | No. de cultivos aislados | Porcentaje * |
|----------------------------------|--------------------------|--------------|
| <u>Pasteurella haemolytica</u> | 9 | 27 |
| <u>Fordetella bronchiseptica</u> | 7 | 21 |
| <u>Corynebacterium spp</u> | 5 | 15 |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | 4 | 12 |
| <u>Pasteurella multocida</u> | 2 | 5 |
| <u>Klebsiella spp</u> | 1 | 3 |
| <u>Pseudomona spp</u> | 1 | 3 |
| Cultivos no identificados | 5 | 15 |
| Total | 34 | 100 % |

* Con respecto a los 34 aislamientos.

Figura No. 2 Aislamiento de bacterias de pulmones aparentemente sanos de ganado bovino.



- A: P. multocida
- B: P. haemolytica
- C: Corynebacterium spp
- D: Klebsiella spp
- E: S. aureus
- F: B. bronchiseptica
- G: Pseudomona spp

PRUEBA DE PATOGENICIDAD

La prueba se realizó utilizando 30 ratones en total, de estos 60 fueron para bacterias aisladas de pulmones neumónicos del ganado bovino y 20 para bacterias aisladas de pulmones aparentemente sanos.

En el caso de las colonias aisladas de pulmones neumónicos, la P. haemolytica (12.3×10 ufc/ml.) presentó letalidad para el 60 % de los animales experimentales, (6 de 10 ratones inoculados murieron).

Por otro lado E. multitorica (7.5×10 ufc/ml.) presentó letalidad para el 33 % de los animales de laboratorio, (De 6 ratones inoculados murieron 2).

Corynebacterium spp (15.1×10 ufc/ml.) presentó una letalidad similar, el 33 %. E. aureus (6.8×10 ufc/ml.) presentó una letalidad en el 33 % de los animales experimentales.

Con las colonias de Haemotella bronchiseptica (4.4×10 ufc/ml.) Klebsiella spp, Streptococcus spp, Pseudomonas spp, E. coli y Salmonella spp no pudo ser observado un efecto letal en los animales de laboratorio.

En el caso de los cultivos aislados de pulmones aparentemente normales que se inocularon a los animales experimentales. Ninguno presentó letalidad.

8.- S I E C U S I O N .

Los resultados del presente estudio demostraron que existen un gran número de bacterias involucradas, tanto en pulmones neumónicos como en pulmones aparentemente normales del ganado bovino.

La especie que se aisló con más frecuencia en pulmones neumónicos fue *Pasteurella*, con un 33 % del total de cultivos identificados. Siendo la Pasteurellosis un problema muy serio en nuestro medio, los centros de salud animal de la S.A.R.H. en el estado de Jalisco reporta que la Pasteurellosis ocupa el primer lugar como causa de mortalidad y el tercer lugar como causa de morbilidad en el ganado bovino de 1982 a 1986 (23).

En México, Trigo et al. (30). realizaron en el rastro un estudio en bovinos y encontraron que al 8.9 % de los animales examinados presentaban problemas neumónicos, lo que indica que las enfermedades respiratorias en bovinos de México son importantes. La literatura nos reporta numerosos casos de infecciones en animales domésticos debidas a la *P. haemolytica* y *P. multocida*.

Otras bacterias de gran importancia que se aislaron e identificaron fueron; *Corynebacterium* spp., *Bordetella bronchiseptica* y *S. aureus*. Estos gérmenes también causan neumonía con procesos supurativos localizados, en la mayoría de los casos estos microorganismos se encontraron en pulmones neumónicos por abscesos ocasionados por estos gérmenes o algún traumatismo.

Investigaciones anteriores y recientes nos muestran la presencia de estos microorganismos que son generalmente habitantes normales de las vias respiratorias de animales y pueden adquirir, su patogenicidad en forma repentina, cuando se altera el equilibrio por introducir en el mismo corral portadores de germen, sobrevivientes de epidemias anteriores o por la contaminación a través del suelo, alimentos, agua de bebida y utensilios contaminados por excrementos, exudado nasal o pus. En estas circunstancias y además alguna causa que predispone a favorecer la aparición de la enfermedad, como, cambios de temperatura, humedad, factores irritantes en la atmosfera, mala nutrición, mal manejo, transportación prolongada y estrés (1, 4).

Un estudio realizado anteriormente sobre bacterias aisladas en el tracto respiratorio de conejos muertos por problemas respiratorios, muestran gran cantidad de bacterias involucradas, de las cuales la *Pasteurella* ocupa el primer lugar de mortalidad (18, 19).

En otro estudio hecho sobre el aislamiento e identificación de bacterias del tracto respiratorio en cerdos, mencionan a la *Pasteurella* relacionada con la *Bordetella bronchiseptica*, como causa de neumonía. De acuerdo a estos trabajos sabemos que no es una enfermedad que afecta exclusivamente al ganado bovino, sino que también afecta a otras especies animales de nuestro País (29).

De las muestras que se obtuvieron de los pulmones aparentemente normales, encontramos un menor número de colonias aisladas en los diferentes medios de cultivo utilizados, pero fueron en varios casos los mismos microorganismos, que se identificaron en las muestras de los pulmones neumónicos del ganado bovino.

De acuerdo a los resultados, las bacterias aisladas e identificadas de pulmones neumonicos, pueden ser microorganismos saprofitos comunes del tracto respiratorio, que actuan como oportunistas en las infecciones del tracto respiratorio inferior.

En el caso de las pruebas de patogenicidad, la cepa mas virulenta fue la P. haemolytica, con un 60% de letalidad, siguiendole P. multocida, S. aureus, y Corynebacterium spp con un 33 %. En las pruebas con los cultivos restantes, no se observo mortalidad en los animales en experimentacion.

Es importante combatir las neumonias para el desarrollo de la ganaderia en Mexico, ya que no se puede erradicar la enfermedad, debido a que son microorganismos comensales del tracto respiratorio de los animales y se encuentran distribuidos ampliamente en el medio ambiente. Entoces se hace necesario un manejo zootecnico adecuado y una vacunacion de los animales.

9.- CONCLUSIONES.

- 1.- De acuerdo a la investigación realizada la existencia de pasteurellosis pulmonar en los bovinos fue del 24% para P. haemolytica y 9% para P. multocida.
- 2.- Otra de las bacterias encontrada en los pulmones neumonicos de mayor frecuencia fue Staphylococcus aureus con el 17% de aislamientos. La bacteria que ocupo el tercer lugar en cuanto a No. de cultivos aislados fue Corynebacterium spp con un 15% .
- 3.- Las bacterias que presentaron letalidad para los animales de experimentacion fueron P. haemolytica con 60% , P. multocida 33% , Staphylococcus aureus 33% y Corynebacterium spp 33%. Las bacterias aisladas de pulmones sanos no presentaron letalidad.
- 4.- Las bacterias aisladas de mayor frecuencia en los pulmones sanos fueron P. haemolytica con 27% , B. bronchiseptica con 21% , Corynebacterium spp con el 15% y Staphylococcus aureus 12% .
- 5.- En vista de la similitud de las cepas aisladas en ambos tipos de pulmones, se puede sugerir, que una de las formas para evitar las neumonias es una buena profilaxis y un mejor manejo del ganado en general.

10.- RESUMEN .

Entre las enfermedades infecciosas que afectan a bovinos, una de las mas diseminadas e importantes es la neumonia. Con el fin de conocer los agentes etiológicos bacterianos, que estan involucrados en la enfermedad fueron tomadas 150 muestras de pulmones neumonicos de bovinos, sacrificados en el matadero municipal de Guadalajara. Asi como tambien 50 muestras de pulmones aparentemente sanos.

Por otra parte, con las bacterias mas frecuentemente aisladas de los pulmones neumonicos, fueron llevadas a cabo pruebas de patogenicidad en animales de laboratorio.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de bacteriologia de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zoot.. Se realizaron pruebas bioquímicas y morfológicas para determinar el tipo de microorganismos aislados y su frecuencia.

De las muestras de pulmones neumonicos, las aisladas con mayor frecuencia fueron: P. haemolytica, con 46 cultivos puros y P. multocida con 18 cultivos puros. Ademas en 15 cultivos fue aislada P. haemolytica junto con otro tipo de bacteria (p. ej. Corynebacterium spp). Esto dio un porcentaje de 41 % para la Pesteurelisis de bovinos, el cual es representativo de la zona occidente del Pais.

Otros generos de bacterias aisladas, ademas de Pasteurella fueron; Corynebacterium spp , S. aureus, B. bronchiseptica, Klebsiella spp, Streptococcus spp, Pseudomona spp, E. coli y Salmonella spp, en orden decreciente de importancia, algunas de estas se relacionan con abscesos pulmonares.

De los pulmones aparentemente sanos, pudieron ser aisladas, P. haemolytica (24%), S. aureus (17%) y Corynebacterium spp (13%), entre las mas importantes. Del total de 50 muestras, 21 resultaron libres de microorganismos y 29 positivas a diferentes bacterias.

Algunas especies bacterianas aisladas en pulmones neumonicos fueron letales en ratones. La P. haemolytica presento un 60% de letalidad, la P. multocida tuvo un 33% , el S. aureus tuvo una letalidad del 33% y lo mismo sucedio con Corynebacterium spp .

Sin embargo con las cepas obtenidas de muestras de pulmones aparentemente sanos, ninguna de estas presento letalidad en los animales de laboratorio.

Estos resultados sugieren que los problemas neumonicos en bovinos van a estar continuamente presentes, ya que las bacterias que forman parte de la flora normal del aparato respiratorio, pueden ocasionar problemas neumonicos. Por consiguiente se deben tomar medidas de prevencion necesarias, para disminuir la incidencia de las neumonias en bovinos.

11.- B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Acosta Espinosa, M. D. (1989). Enfermedades producidas por *Pasteurella* con especial referencia en enfermedades respiratorias en bovinos. Tesis de Licenciatura, Fac. de Ciencias. U de G.
- 2.- Acha P. N., B. Oris Seyfres (1973). Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al hombre y a los Animales. Ed. Espaxs.
- 3.- Andrade Dos Santos J. (1981). Patología General de los Animales Domésticos. 2da Edición Editorial Interamericana, Mexico D. F.
- 4.- Blobel R. y Th. Schliesser (1980). Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II. Editorial Gustav Fischer.
- 5.- Blood J. A. Henderson, y D. M. Radostits (1979). Veterinary Medicine A. Textbook of the Diseases of Sheep, Pigs and Horses. Fifth Edition Bailliere Tindal.
- 6.- Blood J. A. Hend. (1986). Medicina Veterinaria. 6ta Edición, Editorial Interamericana, Mexico D. F.
- 7.- Buchanan R. E. and N. E. Gibbons, (1984). Bergey's Manual, de Systematic Bacteriology. Vol. 1, The Wilkins and Williams Company, Baltimore. Eighth Edition.
- 8.- Burrows W. (1979). Textbook of Microbiology. Twenty-First Edition. W. B. Saunders Company.
- 9.- Cadberry J. L. y Miller N. G. 1977. Use of Bacteriophages as in adjunct in the Identification of *P. multocida*. Am. J. Vet. Res. Vol. 38. 1. 129-130.
- 10.-Carter S. R. 1979. Procedimientos de Diagnostico en Bacteriología y Micología Veterinaria. Editorial Acribia.

- 11.-Carter G. R. 1984. Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology. 4a Edition. Charles C. Thomas USA.
- 12.-Carter G. R. (1985). Bacteriologia y Micologia Veterinaria. Aspectos Esenciales. Editorial Manual Moderno.
- 13.-Cowan, S. F., Steel, K. J., Shaw, C. y Duguid, J. P. (1960). A Classification of the Klebsiella group. J. Gen. Microbiol. 23, 601-612
- 14.-Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg y W. B. Wood (1974). Tratado de Microbiologia. Editorial Salvat.
- 15.-Frank H. G. and Smith S. F. (1983): Prevalence of P. haemolytica in transported calves. Am. J. Vet. Res. 44. 981-985.
- 16.-Frappe M. R. C. (1986). Manual de Infectologia Veterinaria Enfermedades Bacterianas y Micoticas. Editor Mendez Orozco Fco.
- 17.-Freeman, R. (1984). Tratado de Microbiologia de Burrows. Edicion 21. Editorial Interamericana, Mexico D. F.
- 18.-Galindo Garcia A. (1977). Bacterias encontradas en el tracto respiratorio de conejos muertos por problemas respiratorios en las explotaciones de la zona centro de Jalisco. Tesis de Licenciatura, F.M.V.Z., U. de G.
- 19.- Galindo Preciado D. (1977). Bacterias encontradas en el tracto respiratorio de conejos sanos en la zona centro del Estado de Jalisco. Tesis de licenciatura, F. M. V. Z., U. de G..
- 20.-Hernandez-Trigo L. G., F. Rodriguez y E. Suarez (1979). XI Congreso Nacional de Microbiologia, Zapopan Jalisco.
- 21.-Jaramillo Meza L., F. Aguilar-Romero, F. J. Trigo Tavera (1987). Serotipificacion de P. haemolytica y determinacion de los tipos capsulares de P. multocida, aisladas de pulmones neumaticos de cerdos en Mexico, Vet. Mex. U.N.A.M. 18, 185-188.

- 22.- Jawetz, E. J. , L. Melnick y E. A. Adelberg . (1983). Microbiología Médica , 10 a Edición. Editorial Manual Moderno, S.A. , Mexico D.F..
- 23.- Jefatura de Servicios Técnicos Pecuarios Especializados, (1987). Delegación Estatal SARR, Jalisco.
- 24.- Jubb, K.V.F. y P. C. Kennedy, (1963). Pathology of Domestic Animals. Academic Press, New York, San Francisco, London, Vol 2.
- 25.- Jubb, K. V.F., P. C. Kennedy and N. Palmer, (1985). Pathology of Domestic Animals. Vol. 3, 3d Edition, Academic Press, Orlando.
- 26.- Kielwein, G. (1981). Pseudomonas; En , Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band III. Editorial Gustav Fischer , 1a Edición.
- 27.- Lennette, E. H., A. Balows, W. J. Hauster Jr. y H. Jean Shadomy, (1985). Manual of Clinical Microbiology. Fourth Edition. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C..
- 28.- Manual Merck de Veterinaria, (1983). 2a Edición, Merck y Cia. Inc.. Rahway N. Y., U.S.A..
- 29.- Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en Mexico (1984). SARR, Mexico, D.F. Octubre .
- 30.- Memorias del Sexto Congreso Latinoamericano de Buiatría (1987). XIII Congreso Nacional de Buiatría, Mexico.
- 31.- Merchant, I. A. y R. A. Packer (1965). Bacteriología y Virología Veterinaria. 2da Edición, Editorial Acribia.
- 32.- Nicolet, J. (1981). Haemobius: En , Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Eds. Blobel H. y Th. Schliesser, 1a. Edición. Editorial Gustav Fischer.

- 33.- Rullier, J. y A. Parodi (1968). Laboratoire et Diagnostic en Médecine Veterinaire. Ed. Vigot Freres.
- 34.- Sanz-Egaña C. (1967). Enciclopedia de la Carne. Editorial Espasa-Calpe S. A. . Madrid.
- 35.- Steel, K.J. y W.T. Cowan. (1982). Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. Cia Editorial Continental, Mexico.
- 36.- Trigo, F. J. (1983). El Virus Respiratorio Sincitial Bovino, en las Neumonías de Bovinos y Ovinos. Vet. Mex. U. N. A. M..
- 37.- Ullman, U. (1977). The growth curves of Enterobacteriaceae and the estimation of L Forms under the influence of cephalosporin antibiotics. Zbl. Bakt. Hyg. 1 Abt. Orig. A 238, 220-227.