



Detección de *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* y *Mycoplasma bovis* en pulmón de bovinos



Seyda Cengiz ^{a*}

M. Cemal Adıgüzel ^a

Gökçen Dinç ^b

^a Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology 25240 Erzurum. Turkey.

^b Erciyes University Faculty of Medicine Department of Microbiology Kayseri. Turkey.

* Autor de correspondencia: seydacengiz@atauni.edu.tr

Resumen:

En este estudio se tuvo como objetivo determinar *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* y *M. bovis* en pulmones de bovinos macroscópicamente sanos mediante PCR. El estudio se llevó a cabo en 82 pulmones de bovinos macroscópicamente sanos. Se realizó la extracción de ADN de las muestras pulmonares. Después, se realizó la PCR utilizando todos los cebadores específicos. Mediante evaluación molecular, se lograron resultados positivos para *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* y *M. bovis* en 4 (4.8 %), 4 (4.8 %), 6 (7.3 %) y 3 (3.6 %) de las muestras, respectivamente. Se detectaron infecciones mixtas en cinco muestras. De las muestras, dos fueron positivas tanto para *P. multocida* como para *M. haemolytica*, dos fueron positivas tanto para *M. haemolytica* como para *H. somni* y una fue positiva tanto para *P. multocida* como para *H. somni*. Sin embargo, no se detectó una muestra positiva que transportara todos los patógenos. En conclusión, *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* y *M. bovis* son los patógenos oportunistas importantes del tracto respiratorio en bovinos y estos patógenos tienen un papel importante durante las infecciones. Pero la naturaleza multifactorial de la enfermedad respiratoria bovina y el sistema inmunológico

afectaron la formación de la enfermedad. Por lo tanto, en primer lugar, se debe fortalecer la inmunidad de los bovinos y se deben mantener bajo control otras condiciones.

Palabras clave: Bovinos, Análisis molecular, Pulmón, Enfermedades respiratorias.

Recibido: 07/08/2019

Aceptado: 07/12/2020

Introducción

La enfermedad respiratoria bovina (ERB) es uno de los principales problemas de salud en becerros y bovinos adultos, y tiene un gran impacto económico en la industria ganadera⁽¹⁻³⁾. La ERB en los hatos causa pérdidas económicas debido al aumento de los costos de tratamiento, la disminución de la producción y el sacrificio⁽⁴⁾. La ERB tiene una etiología compleja, que involucra agentes bacterianos y virales. Además, algunos factores predisponentes, como las fallas de manejo, los problemas ambientales y de defensa del hospedero influyen en la ocurrencia de infecciones⁽⁵⁾.

Los agentes bacterianos más frecuentemente aislados de la enfermedad respiratoria son *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Histophilus somni* (*H. somni*) y *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*)⁽⁶⁻⁷⁾. *Pasteurella multocida* es uno de los principales patógenos bacterianos y conduce a síntomas clínicos durante la ERB en becerros neonatales y bovinos. La bacteria, que se detecta no solo en bovinos infectados sino también en los sanos, se aísla de hisopos pulmonares, nasofaríngeos y nasales y de los lavados transtraqueales. Por lo tanto, el diagnóstico de *P. multocida* se convierte en un problema si se detectan síntomas clínicos asociados con neumonía en bovinos⁽⁸⁾.

Del mismo modo, *M. haemolytica* se presenta normalmente en la mucosa nasal faríngea en bovinos sanos. Sin embargo, la bacteria se convierte en un patógeno en condiciones inadecuadas, como deficiencia nutricional y estabulación sobrepoblada e infecciones virales. Tras la rápida proliferación de *M. haemolytica* dentro del pulmón infectado, se presenta bronconeumonía fibrinopurulenta grave. Además, produce una potente leucotoxina que destruye los macrófagos y los neutrófilos^(9,10). Debido a estas propiedades, esta bacteria se acepta como el patógeno más dañino para el pulmón.

H. somni es una bacteria que normalmente se presenta no solo en el tracto respiratorio sino también en el tracto reproductivo. Al igual que con los patógenos mencionados anteriormente, *H. somni* también está causando infecciones como meningoencefalitis

trombótica (MET), neumonía, septicemia, mastitis, artritis, miocarditis e infecciones reproductivas bajo condiciones inapropiadas con síntomas clínicos^(5,11-13).

M. bovis no es sólo enfermedad respiratoria sino también produce artritis, mastitis, infecciones genitales y abortos⁽³⁾. Infecciones moderadas en bovinos que tienen el potencial de causar una infección con manifestaciones clínicas graves de bacterias, así como dificultad de diagnóstico, resistencia a penicilina y sus derivados; también existe un problema importante en las explotaciones de cría de ganado con el mecanismo de resistencia de los antibióticos⁽¹⁴⁾. Al mismo tiempo, la rápida propagación de bacterias en el hato bovino fue un resultado de *M. bovis* que lo hace importante⁽¹⁵⁾.

La ERB se conoce como infección polimicrobiana en hatos bovinos y se registra principalmente en vacas más jóvenes⁽¹³⁾. Por lo tanto, el diagnóstico de la ERB requiere el uso de diferentes métodos (convencionales y moleculares) para determinar las bacterias que son efectivas en la etiología. En particular, el uso de diferentes medios, las condiciones de incubación (temperatura y relación O₂) y las diferencias entre los métodos de diagnóstico convencionales requieren el uso de métodos más rápidos. El diagnóstico molecular de los patógenos basado en técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se puede utilizar para la identificación y evaluaciones detalladas. Las técnicas moleculares, que son más sensibles que los métodos bacteriológicos, son preferidas, especialmente para la identificación directa de patógenos a partir de muestras de tejido^(8,9,15,16).

El objetivo de este estudio fue determinar *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* y *M. bovis* de pulmones de bovinos macroscópicamente sanos mediante PCR.

Material y métodos

Procedimiento de muestreo

Se recogieron un total de 83 muestras de pulmón de diferentes mataderos. Se tomó una pieza de muestra de pulmón de los pulmones sin lesiones y se colocó en tubos estériles transportados al laboratorio con cadena de frío.

Cultivo y extracción de ADN

Se tomó una pieza de muestra y se colocó en el tubo Eppendorf. Brevemente, cada muestra se colocó en placas de Petri estériles y luego las muestras se dividieron en partes utilizando bisturís y bolígrafos estériles. El cultivo en caldo solo se usó para *M. bovis*. Una pieza de muestra de pulmón para el aislamiento de *M. bovis* inoculada en un medio de caldo PPLO e

incubada a 37 °C en %5 de CO₂ durante 5 días. Se utilizaron cultivos en caldo PPLO para la extracción de ADN de *M. bovis*, se utilizaron muestras de pulmón lisadas para la extracción de ADN de otras bacterias. El ADN se extrajo de las muestras de pulmón mediante el uso de un kit para purificación de ADN genómico (Qiagen-DNeasy Blood and Tissue Kit-EE. UU.). Se siguieron las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa

Los procedimientos de PCR, que involucraron condiciones de ciclo y mezcla de reacción, se realizaron de acuerdo con informes anteriores^(17,18,19) (Cuadro 1). La mezcla de reacción se preparó con un volumen total de 50 µl que contenía 3 mM de MgCl₂, 200 µl de dNTP, 0.5 µM de cada cebador y 1.25 unidades de ADN polimerasa Taq (Vivantis, MY) con revisiones menores para patógenos. Se utilizó ADN extraído (1 µL) como molde. La amplificación se llevó a cabo mediante un termociclador (The SuperCycler Trinity, Kyratech, AU). Todas las muestras de los productos de la amplificación por PCR (10 µL) fueron sometidas a electroforesis. El ADN se visualizó mediante fluorescencia UV después de la tinción con bromuro de etidio.

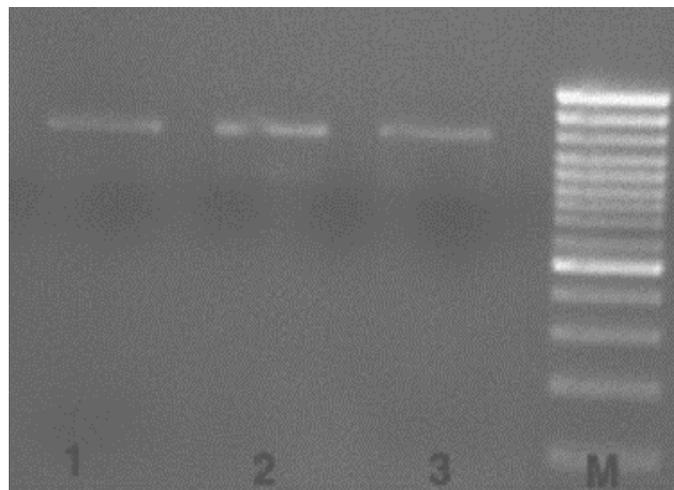
Cuadro 1: Condiciones de PCR y secuencias de oligonucleótidos

Patógeno	Condición del ciclo (°C/min)	Oligonucleótidos	Par de bases (bp)	Referencia
<i>P. multocida</i>	94/1	F:GGCTGGGAAGCCAAATCAAAG	1432	Miflin y Blackall, 2001
	69/1 30 cic			
	72/1	R:CGAGGGACTACAATTACTGTAA		
<i>M. haemolytica</i>	94/1	F:TGTGGATGCGTTTGAAGAAGG	1145	Akan <i>et al.</i> , 2006
	55/1 30 cic			
<i>H. somni</i>	72/1	R:ACTTGCTTTGAGGTGATCCG	400	Angen <i>et al.</i> , 1998
	94/1	F:GAAGGCGATTAGTTTAAGAG		
	55/1 35 cic			
<i>M. bovis</i>	72/1	R:TTCGGGCACCAAGTRTTCA	447	Foddai <i>et al.</i> , 2005
	94/1	F: TATTGGATCAACTGCTGGAT		
	54/1 30 cic			
	72/1	R: AGATGCTCCACTTATCTTAG		

Resultados

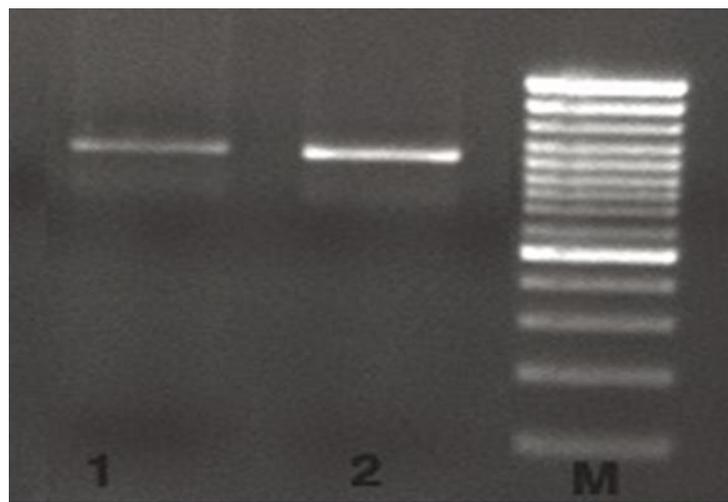
En la evaluación molecular, se obtuvieron resultados positivos para *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* y *M. bovis* en 4 (4.8 %), 4 (4.8 %), 6 (7.3 %) y 3 (3.6 %) de las muestras, respectivamente (Figura 1-3). Se detectaron infecciones mixtas en cinco muestras. De las muestras, dos fueron positivas tanto para *P. multocida* como para *M. haemolytica*, dos fueron positivas tanto para *M. haemolytica* como para *H. somni* y una fue positiva tanto para *P. multocida* como para *H. somni*. No obstante, no se detectó una muestra positiva que transportara todos los patógenos.

Figura 1: Evaluación molecular de *P. multocida*

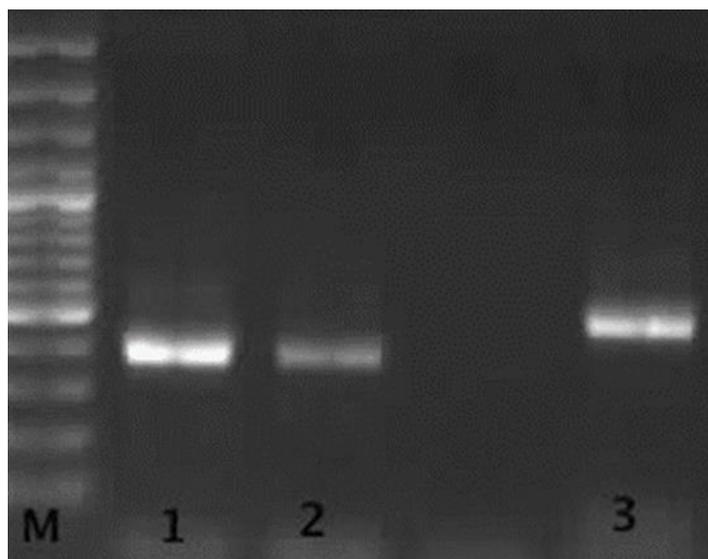


M= Marcador (100 pb ADN Ladder Plus), 1-3= *P. multocida*

Figura 2: Evaluación molecular de *M. haemolytica*



M= Marcador (100 pb ADN Ladder Plus), 1-2= *M. haemolytica*

Figura 3: Evaluación molecular de *H. somni* y *M. bovis*

M= Marcador (100 pb ADN Ladder Plus), 1-2= *H. somni*, 3= *M. bovis*

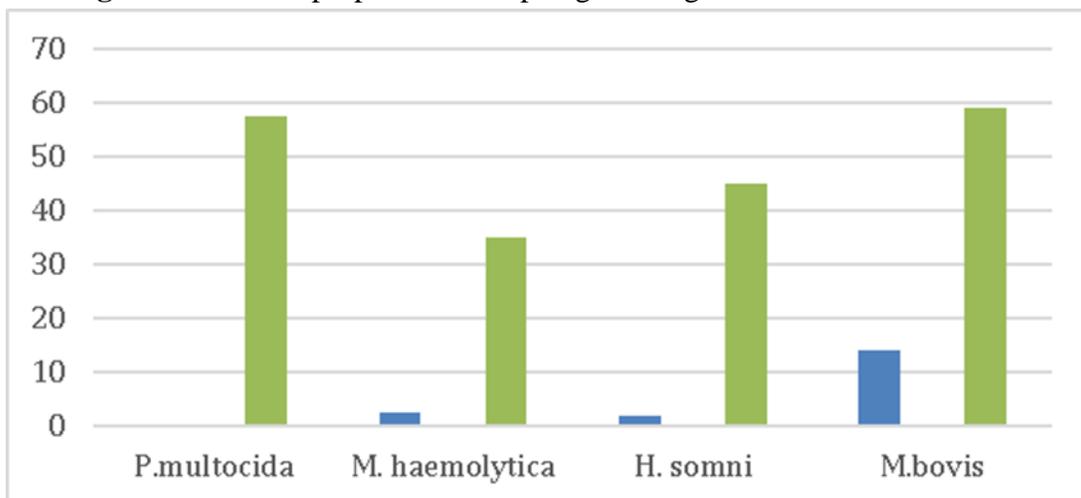
Discusión

Las enfermedades respiratorias bovinas, que causan pérdidas económicas debido a la disminución de la producción y el sacrificio, tienen una gran importancia en los hatos bovinos. Aunque, bovinos de todas las edades y sexos es susceptible a la enfermedad, es más perjudicial para los becerros^(6,20,21). Las bacterias que causan infecciones respiratorias pueden transmitirse de animales curados o inmunológicamente fuertes (sin signos clínicos) a animales sensibles^(2,22). Además de los patógenos, algunos factores predisponentes como los establos sobrepoblados y mal ventilados, la alimentación inadecuada y otras enfermedades infecciosas aumentaron el riesgo de infección. En estos hatos, la transmisión suele producirse de forma horizontal^(7,9,23). Los estudios previos generalmente se centraron en la detección de *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* y *M. bovis* en las amígdalas, nasofaringe y el tracto respiratoria superior en animales portadores^(2,24,25). En los reportes se obtuvieron varios resultados sobre la presencia de patógenos en las vacas. La positividad de *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* y *M. bovis* en bovinos varió entre 0.4-57.4 %, 1.6-35 %, 2-45 % y 14-59 % en reportes anteriores (Figura 4)^(9,19,26,27,28,29,30).

En el presente estudio, se encontró que el número de animales positivos identificados para *P. multocida* fue menor que el descrito por Onat *et al*⁽²⁸⁾, pero fue más alto que en otros^(24,27). Se encontró que la positividad de *M. haemolytica* fue más baja que otros trabajos^(2,27,29), pero fue más alta que lo encontrado por Hajikolaei *et al*⁽²⁰⁾. En cuanto a la positividad, se encontró que *H. somni* y *M. bovis* fueron diferentes de otros estudios. En los estudios, en ambas bacterias, se evaluaron diferentes métodos de diagnóstico en vacas neumónicas^(15,30,31).

Además, la variación entre los resultados puede estar asociada con la diferencia en los métodos de diagnóstico, la vacunación y las propiedades bacterianas^(2,23,29). Por ejemplo, los métodos de cultivo convencionales pueden ser inadecuados en la detección de patógenos en vacas sanas debido a un menor recuento bacteriano en las muestras. Asimismo, la vacunación puede reducir el transporte de bacterias y lesiones^(16,32,33). Además, la detección de algunos patógenos del sistema respiratorio como *H. somni* y *M. bovis* en medios de cultivo es difícil aunque las muestras se recojan de vacas infectadas^(9,19). Así, se sugieren pruebas de PCR, que implican cebadores específicos para el ARNr 16S, para la identificación de esta bacteria durante las infecciones respiratorias mixtas^(5,13). Por lo tanto, las técnicas moleculares basadas en material genético, que permiten la detección de los patógenos a pesar de un recuento bacteriano menor, serían preferibles en lugar de los métodos de cultivo en la determinación de las vacas portadoras^(16,34).

Figura 4: Cambio proporcional de patógenos según estudios^(9,20,24,27,29,30,31)



La presencia de estas bacterias en ausencia de síntomas clínicos en animales o lesiones macroscópicas en la necropsia respalda el carácter oportunista de estas bacterias. Sin embargo, en estos casos, se deben realizar exámenes histopatológicos y se debe cuestionar el estado de salud del animal. Además, debido a que la aparición de la enfermedad tiene asociación con el transporte^(22,24,27,35), la detección de animales reservorios es importante para la reducción del riesgo en los hatos. De modo que, la detección de vacas portadoras, que tienen riesgo potencial de contaminación, es un enfoque para el control⁽²²⁾.

Conclusiones e implicaciones

En conclusión, *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* y *M. bovis*, que causan pérdidas económicas y muerte en animales, también son patógenos oportunistas importantes. Por lo tanto, el sistema inmunológico debe desarrollarse mediante la vacunación en animales.

Además, se deben mejorar las condiciones de estabulación y el manejo, la conciencia del personal (propietario) para establecer un programa de control efectivo y sostenible de las enfermedades del sistema respiratorio.

Literatura citada:

1. Headley SA, Alfieri AF, Oliveira VHS, Beuttemüller EA, Alfieri AA. *Histophilus somni* is a potential threat to beef cattle feedlots in Brazil. *Vet Rec* 2014;175:249-250.
2. Jaramillo-Arango CJ, Hernandez-Castro R, Suarez-Guemes F, Martinez-Maya JJ, Aguilar-Romero F, Jaramillo-Meza L, Trigo FJ. Characterisation of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudate and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. *Res Vet Sci* 2008;84:7-13.
3. Margineda GA, Zielinski GO, Jurado S, Alejandra F, Mozgovej M, Alcaraz AC, López A. *Mycoplasma bovis* pneumonia in feedlot cattle and dairy calves in Argentina. *Braz J Vet Pathol* 2017;10(2):79 – 86.
4. Angen Ø, Thomsen J, Larsen LE, Larsen J, Kokotovic B, Heegaard PMH, Enemark JMD. Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein respons. *Vet Microbiol* 2009;137:165-171.
5. Tegtmeier C, Angen SNG, Riber U, Friis NF. Aerosol challenge of calves with *Haemophilus somnus* and *Mycoplasma dispar*. *Vet Microbiol* 2000;72:229-239.
6. Klima CL. Characterization of the genetic diversity and antimicrobial resistance in *Mannheimia haemolytica* from feedlot cattle [Thesis]. Alberta, Canada: University of Lethbridge; 2009.
7. Kurćubić VS, Đoković RD, Ilić ZZ, Stojković JS, Petrović MP, Petrović VC. Modern approach to the enigma of bovine respiratory disease complex: A review. *Pak Vet J* 2014; 34:11-17.
8. Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 2008;8:129-150.
9. Tegtmeier C, Angen Ø, Ahrens P. Comparison of bacterial cultivation, PCR, *in situ* hybridisation and immunohistochemistry as tools for diagnosis of *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle. *Vet Microbiol* 2000;76:385-394.
10. Bielsa JM. New solution for the control of the bovine respiratory complex. Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants (FeMeSPrum) Zadar, Croatia, 2008;35-42.

11. Humphrey JD, Stephens LR. *Haemophilus somnus*: a review. Vet Bull 1983;53:987-1004.
12. Corbeil LB, Widders PR, Gogolewski RP, Arthur JE, Inzana TJ, Ward ASC. *Haemophilus somnus*: bovine reproductive and respiratory disease. Can Vet J 1986;27:90-93.
13. Angen Q, Ahrens P, Tegtmeier C. Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. Vet Microbiol 1998;63:39-48.
14. Nicholas RAJ. Recent developments in the diagnosis and control of mycoplasma infections in cattle. 23rd. World Buiatric Congress, Canada. 2004.
15. Petersen MB. *Mycoplasma bovis* in dairy cattle. [PhD Thesis] Denmark, Department of Veterinary and Animal Sciences Faculty of Health and Medical Sciences. University of Copenhagen; 2018.
16. Casademunt S. The role of *Histophilus somni* in bovine respiratory disease: An update. 2011. www.hipra.com. Accessed 30 May, 2018.
17. Mifflin JK, Blackall P. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. Lett App Microbiol 2001;33:216-221.
18. Akan M, Oncel T, Sareyyupoglu B, Haziroglu R, Tel OY, Cantekin Z. Vaccination studies of lambs against experimental *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* infection. Small Ruminant Res 2006;65:44–50.
19. Foddai A, Idini G, Fusco M, Rosa N, Fe A, Zinellu S, Corona L, Tola S. Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. Mol Cell Prob 2005;19:207-212.
20. Hajikolaei HMR, Ghorbanpour M, Sayfi-Abadshapouri MR, Rasooli A, Ebrahimkhani D, Jabbari AR. Bacteriological and serological studies on *Mannheimia haemolytica* infection in cattle slaughtered at Ahvaz (southwestern Iran) abattoir. Iranian J Vet Res 2010;11:84-87.
21. Headley SA, Oliveira VH, Figueira GF, Bronkhorst DE, Alfieri AF, Okano W, Alfieri AA. *Histophilus somni*-induced infections in cattle from southern Brazil. Trop Anim Health Prod 2013;45:1579–1588.
22. Dziva F, Muhairwa A, Bisgaard M, Christensen H. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 2007;128:1-22.

23. Taylor JD, Fulton RW, Mady DS, Lehenbauer TW, Confer AW. Comparison of genotypic and phenotypic characterization methods for *Pasteurella multocida* isolates from fatal cases of bovine respiratory disease. J Vet Diagn Invest 2010;22:366-375.
24. Hajikolaei HMR, Ghorbanpour M, Seyfi-Abadshapouri MR, Rasooli A, Moazeni Jula GR, Ebrahimkhani D. Study on the Prevalence of *Pasteurella multocida* carriers in slaughtered cattle and relationship with their immunity status at Ahvaz Abattoir. J Vet Res 2008;63:31-35.
25. Aebi M, Borne BHP, Raemy A, Steiner A, Pilo P, Bodmer M. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. Acta Vet Scan 2015;57:1-11.
26. Hajikolaei HMR, Ghorbanpour M, Sayfi-Abadshapouri MR, Rasooli A, Jahferian H. Occurrence of *Pasteurella multocida* in the nasopharynx of healthy buffaloes and their immunity status. Bull Vet Inst Pulawy 2006;50:435-438.
27. Barbour EK, Nabbut NH, Hamadeh SK, Al-Nakhli HM. Bacterial identity and characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and calves. Vet Res Commun 1997;21:421- 430.
28. Onat K, Kahyaoğlu S, Çarlı KT. Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. Turk J Vet Anim Sci 2010;34:91-94.
29. Alexander TW, Cook S, Klima CL, Topp E, McAllister TA. Susceptibility to tulathromycin in *Mannheimia haemolytica* isolated from feedlot cattle over a 3-year period. Front Microbio 2013;4:1-8.
30. Tenk M. Examination of *Mycoplasma bovis* infection in cattle [PhD Thesis]. Budapest: Szent Istvan University; 2005.
31. D'Amours GH, Ward TI, Mulvey MR, Read RR, Morck DW. Genetic diversity and tetracycline resistance genes of *Histophilus somni*. Vet Microbiol 2011;150:362–372.
32. Pérez DS, Pérez FA, Bretschneider G. *Histophilus Somni*: Pathogenicity in cattle. An update. An Vet (Murcia) 2010;26:5-21.
33. Lipsitch M. Vaccination against colonizing bacteria with multiple serotypes. Proc Natl Acad Sci 1997;94:6571–6576.
34. Deressa A, Asfaw Y, Lubke B, Kyule MW, Tefera G, Zessin KH. Molecular Detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in sheep respiratory infections in Ethiopia. Intern J Appl Res Vet Med 2010;8:101-108.

35. Derosa DC, Mechor GD, Staats JJ, Chengappa MM, Shryock TR. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. J Clin Microbiol 2000;38:327–332.