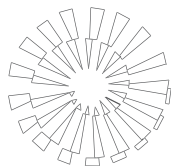


Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de exudado nasal de bovinos, en dos cuencas lecheras de México



Phenotypic and molecular strain characterization of *Pasteurella multocida* isolated from cattle nasal exudate from two dairy complexes in Mexico

Víctor Manuel Campuzano Ocampo* Alma Delia González Rodríguez** Rigoberto Hernández Castro***
Francisco Suárez Güemes** Francisco José Trigo Tavera† Carlos Julio Jaramillo Arango*

Abstract

Two hundred and fifty strains of *P. multocida* isolated from nasal exudate were obtained, 182 clinically healthy bovine strains and 68 clinically ill with pneumonia bovine strains, from two dairy complexes, one in the Tizayuca region of Hidalgo state ($n = 81$), and another in the Region Lagunera of the states of Coahuila and Durango ($n = 169$), Mexico. Strains were identified by conventional biochemical tests and API 20NE commercial system. Capsular typing was performed by testing hyaluronidase and acriflavine, as well as by a multiplex PCR for amplification of genes *hyaC-hyaD* and *dcfF*. The overall results of hyaluronidase by the test showed that 90.4% (226/250) of the strains were capsular type A and through the acriflavine test 9.6% (24/250) was capsular type D. Using the multiplex PCR, 92% (230/250) was capsular type A and 8% (20/250) was capsular type D. The comparison of results between biochemical tests and PCR are consistent in identifying strains of capsular type A but not with the capsular type D. It was possible to confirm that capsular type A of *P. multocida* is predominant in Mexico.

Key words: *PASTERURELLA MULTOCIDA*, CAPSULAR TYPES, PHENOTYPIC CHARACTERIZATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION, NASAL EXUDATE, CATTLE, PCR.

Resumen

Se obtuvieron 250 cepas de *P. multocida* aisladas de exudado nasal, 182 cepas de bovinos clínicamente sanos y 68 cepas de bovinos clínicamente enfermos de neumonía, de dos complejos lecheros, uno en la región de Tizayuca estado de Hidalgo ($n = 81$), y otro en la Región Lagunera de los estados de Coahuila y Durango ($n = 169$), México. Las cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales y el sistema comercial API 20NE. La tipificación capsular se realizó por medio de las pruebas de hialuronidasa y acriflavina, así como por medio de una PCR múltiple para la amplificación de los genes *hyaD-hyaC* y *dcfF*. Los resultados globales mediante la prueba de hialuronidasa mostraron que 90.4% (226/250) de las cepas fueron del tipo capsular A y por medio de la prueba de acriflavina, 9.6% (24/250) fue del tipo capsular D. Por medio de la PCR múltiple, 92% (230/250) fue tipo capsular A y 8% (20/250) fue tipo capsular D. La comparación de los resultados entre las pruebas bioquímicas y la técnica de PCR concuerdan en la identificación de las cepas del tipo capsular A, pero no así con las del tipo capsular D. Se corrobora que en México el tipo capsular predominante de *P. multocida* es el A.

Palabras clave: *PASTERURELLA MULTOCIDA*, TIPOS CAPSULARES, CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, EXUDADO NASAL, BOVINOS, PCR.

Recibido el 18 de mayo de 2010 y aceptado el 14 de diciembre de 2010.

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

**Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

***Dirección de Investigación, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Secretaría de Salud, Av. Calzada de Tlalpan #4800 Col. Sector XVI, 14080, México, D.F.

† Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.
Autor de correspondencia: Carlos Julio Jaramillo Arango, Correo electrónico: cja@servidor.unam.mx

Introduction

Pasteurella multocida is a Gram-negative coccobacillus. Domestic and wild ruminants harbor it as part of their nasal tract. Nevertheless, under certain conditions it turns to an etiological agent of disease that causes great economical losses all over the world.¹⁻⁴ Five capsular types have been identified (A, B, D, E and F), each one generally associated, but not totally restricted to a host. Likewise, it is classified into 16 somatic types (1 to 16). *P. multocida* causes two diseases of great impact in cattle, hemorrhagic septicemia and pneumonic pasteurellosis. Hemorrhagic septicemia is caused by types B and E and affects the water buffalo and cattle in Asia, Central Africa and south of Europe. Capsular types A and D affect cattle worldwide with morbidity and mortality rates that go from 4.6 to 89% and 1 to 13%, respectively.³⁻⁸ The diagnosis of the diseases caused by *P. multocida* has been traditionally based on clinical signs and identification of physicochemical characteristics of the agent. These tests were carried out based on phenotypic characteristics; nevertheless, culture conditions may influence on expression of properties, such as morphology, carbohydrate fermentation and serological properties, and with this decrease sensitivity and specificity of the methods based on these characteristics for bacterial identification.⁹ In recent years, molecular techniques have demonstrated to be a rapid and sensitive method in diagnosis of diseases, particularly in outbreaks. The development of multiplex PCR type-specific for *P. multocida* has enlarged the knowledge of the agent and the epidemiology of the disease.¹⁰

For the development of multiplex PCR that allows the identification of *P. multocida* capsular types, specific primers were designed with the following selection criterion: primers were localized within the established genes for each one of the capsular types (*hyaD*, *bcbD*, *dcfF* *ecfJ* and *fcfI*) and the amplified fragment for each gene allowed to differentiate each capsular type. Genes are found within the region 2 loci that encodes for capsular synthesis.^{11,12}

For the particular case of the capsular types present in Mexico, the genes to amplified were *hyaD-hyaC* for type A that encodes for the synthesis of hyaluronic acid and gene *dcfF* for type D that encodes for the synthesis of one glycosyltransferase.^{11,13}

The objective of the present study was to identify, at molecular level, *P. multocida* strains isolated from cattle nasal exudates from two dairy complexes in Mexico.

Introducción

Pasteurella multocida es un cocobacilo Gram negativo, comensal habitual del tracto respiratorio superior de los rumiantes domésticos y silvestres. Sin embargo, bajo diversas condiciones se convierte en el agente etiológico de enfermedades que ocasionan grandes pérdidas económicas en todo el mundo.¹⁻⁴ Se tienen identificados cinco tipos capsulares (A, B, D, E y F), cada uno generalmente asociado, pero no restringido completamente a un huésped. Asimismo, se clasifica en 16 tipos somáticos (1 al 16). *P. multocida* ocasiona dos enfermedades de gran impacto en el ganado bovino, la septicemia hemorrágica y la pasteurellosis neumónica. La septicemia hemorrágica es producida por los tipos B y E y afecta a los búfalos de agua y al ganado bovino en Asia, África Central y sur de Europa. Los tipos capsulares A y D afectan al ganado bovino en todo el mundo con tasas de morbilidad y mortalidad que oscilan de 4.6 a 89% y 1 a 13% respectivamente.³⁻⁸ El diagnóstico de las enfermedades producidas por *P. multocida* se ha basado tradicionalmente en signos clínicos y la identificación de características fisicoquímicas del agente. Estas pruebas se realizan con base en características fenotípicas; sin embargo, las condiciones de cultivo pueden influir en la expresión de propiedades, como la morfología, fermentación de carbohidratos y propiedades serológicas, y con ello disminuir la sensibilidad y la especificidad de los métodos basados en estas características para la identificación bacteriana.⁹ En años recientes las técnicas moleculares han demostrado ser un método rápido y sensible para el diagnóstico de las enfermedades particularmente en los casos de brote. El desarrollo de técnicas de PCR múltiple tipo específico para *P. multocida* ha aumentado el conocimiento del agente y de la epidemiología de la enfermedad.¹⁰

Para el desarrollo de la PCR múltiple que permite la identificación de los tipos capsulares de *P. multocida* se diseñaron iniciadores específicos con el siguiente criterio de selección: los iniciadores fueron localizados dentro de los genes establecidos para cada uno de los tipos capsulares (*hyaD*, *bcbD*, *dcfF* *ecfJ* y *fcfI*) y el fragmento amplificado para cada gen permitió diferenciar a cada tipo capsular. Los genes se encuentran dentro de la región 2 del loci que codifica para la síntesis capsular.^{11,12}

Para el caso particular de los tipos capsulares presentes en nuestro país, los genes a amplificar fueron *hyaD-hyaC* para el tipo A que codifica para la síntesis de ácido hialurónico y el gen *dcfF* para el tipo D que codifica para la síntesis de una glicosiltransferasa.^{11,13}

El objetivo del presente trabajo fue identificar, a nivel molecular, cepas de *P. multocida* aisladas de

Material and methods

Strain origin and characteristics

Two hundred and fifty strains of *P. multocida* isolated from nasal exudates of 182 clinically healthy bovines and 68 clinically ill with pneumonia were obtained from two dairy complexes, one in the region of Tizayuca state of Hidalgo (TZY) (n= 81) and the other one in the Region Lagunera of the states of Coahuila and Durango (RLA) (n = 169), Mexico.

Bacterial identification

Strains were identified using conventional biochemical tests of oxidase, carbohydrate fermentation and sulfhydryl acid (TSI), utilization of citrate, motility, indole production, urea production and trehalose and esculin fermentation. The definite identification was carried out by the commercial system for Gram-negative bacillus, non-enterobacteria and non-API 20NE demanding.* The results were deposited in Web API software (<http://www.biomerieux.com>) to determine the bacterial genus and species. All processes were carried out following the manufacturer's instructions.

According to the values proposed by the API 20NE system, it was considered that strains with an identification percentage (ID%) above 90% belonged to the same species (*P. multocida*), with an ID% above 80% belonged to the same genus (*Pasteurella* spp) and with an ID% below 80% they had an acceptable profile.

Capsular typing

Capsular typing was carried out by means of biochemical tests described by Carter and Rundell for type A strains (AS) and Carter and Subronto for type D (DS).^{11,12}

Hyaluronidase and acriflavine tests

For hyaluronidase test, the strains were re-cultured in blood agar by continuous stria and were crossed with a nurse strain of *Staphylococcus aureus* producer of hyaluronidase, and incubated for 24 hours. The identification of *P. multocida* AS was observed by a decrease in the size of the near capsule to the nurse strain.

For acriflavine test, strains were placed in 15 ml sterile tubes with 3 ml of brain heart infusion (BHI)* and were incubated at 37°C for 18 h. Subsequently, it was centrifuged at 6 000 g during 10 minutes and 2.5 ml supernatant were discharged to be resuspended with 0.5 ml of a neutral acriflavine solution at 1:1 000; the reaction was visualized at 5 minutes. The identification of strains DS was carried out by the formation of one

exudado nasal de bovinos en dos cuencas lecheras de México.

Material y métodos

Origen y características de las cepas

Se obtuvieron 250 cepas de *P. multocida* aisladas de exudados nasales de 182 bovinos clínicamente sanos y 68 clínicamente enfermos de neumonía, de dos complejos lecheros, uno en la región de Tizayuca estado de Hidalgo (TZY) (n = 81) y otro en la Región Lagunera de los estados de Coahuila y Durango (RLA) (n = 169), México.

Identificación bacteriana

Las cepas fueron identificadas utilizando pruebas bioquímicas convencionales de oxidasa, fermentación de carbohidratos y ácido sulfhídrico (TSI), utilización de citrato, motilidad, producción de indol, producción de urea y fermentación de trehalosa y esculina. La identificación definitiva se realizó mediante el sistema comercial para bacilos Gram negativos, no enterobacterias y no exigentes API 20NE.* Los resultados fueron ingresados en el software API WEB (<http://www.biomerieux.com>), para determinar el género y la especie bacteriana. Todos los procesos se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante.

De acuerdo con los valores propuestos por el sistema de API 20NE, se consideró que las cepas con un porcentaje de identificación (%ID) por encima de 90% pertenecían a la misma especie (*P. multocida*), con un %ID por encima de 80% pertenecían al mismo género (*Pasteurella* spp) y con un %ID debajo de 80% tenían un perfil aceptable.

Tipificación capsular

La tipificación capsular se realizó por medio de pruebas bioquímicas descritas por Carter y Rundell para las cepas del tipo capsular A (SA) y Carter y Subronto para las del tipo capsular D (SD).^{11,12}

Pruebas de hialuronidasa y acriflavina

Para la prueba de hialuronidasa las cepas se sembraron en agar sangre por estría continua y fueron cruzadas con una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* productora de hialuronidasa, e incubadas por 24 horas. La identificación de las cepas de *P. multocida* del SA se observó por una disminución en el tamaño de la cápsula cercana a la cepa nodriza.

*BioMeriux, Francia.

follicle. For both tests, reference strains of *P. multocida* A and D were used (donated by Dr. GH Frank and Dr. B. Briggs, NADC, USDA) and as negative control, a *E. coli* DH5 α .

Cromosomal DNA extraction

DNA was obtained by the boiling method; shortly, with the help of the inoculating loop the bacteria smear was deposited in 200 μ l of sterile water, which was subjected to a temperature of 92°C for 15 minutes, it was centrifuged at 6 000 *g* during 15 minutes, and 5 μ l of supernatant were collected and used as template in the mixture for PCR.

Capsular typing by PCR

Capsular types were determined by a multiplex PCR, based on the protocol described by Townsend *et al.*,¹³ for amplification of genes *hyaD-hyaC* and *dcbF*.

Afterwards, 32.5 μ l of distilled sterile water, 5 μ l of 1 $\times$ PCR buffer, 3 μ M MgCl₂, 1.6 μ M of dNTP'S, 3.6 μ M of each one of the primers, 5 μ l of DNA and 2.5 U of Taq DNA Polymerase were deposited; amplification was carried out in a thermocycler under the following conditions: an initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing temperature of 56.5°C for 30 seconds and extension at 72°C during 30 seconds for 30 cycles. The final extension was carried out at 72°C for 5 minutes in order to amplify genes *hyaD-hyaC* for AS and gene *dcbF* for DS. Visualization of the amplified products was done in agarose gel at 1% stained with ethidium bromide. The molecular weight marker 1 KB Plus (Invitrogen) was used. The size of the amplified product for AS was 1 044 pb and for DS of 657 pb. In each multiplex PCR, reference strains of *P. multocida* AS and *P. multocida* DS were used and as negative control an *E. coli* DH5 α was used.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out with the Epidemiological Analysis of Tabulated Data version 3.0 (EPIDAT), Organizacion Panamericana de Salud (OPS/OMS) 2003.

With the obtained results, frequencies of capsular types (A and D), identified in each one of the groups according to the capsular or molecular identification, were calculated.

The determination of concordance between the results of the PCR tests and the results of the hyaluronidase and acriflavine tests was carried out by absolute concordance and specific concordance calculation, and Kappa test.^{14,15}

Para la prueba de acriflavina las cepas fueron depositadas en tubos de 15 ml estériles con 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI)* y se incubaron a 37°C por 18 h. Posteriormente, se centrifugaron a 6000 *g* durante 10 minutos y se eliminaron 2.5 ml del sobrenadante, para después ser resuspendidos con 0.5 ml de una solución de acriflavina neutra 1:1,000; la reacción se visualizó a los 5 minutos. La identificación de cepas del SD se realizó por la formación de un flóculo. Para ambas pruebas se utilizaron cepas de referencia *P. multocida* A y D (donadas por el Dr. GH Frank y el Dr. B. Briggs, NADC, USDA) y como testigo negativo, una cepa de *E. coli* DH5 α .

Extracción de ADN cromosomal

El ADN fue obtenido por el método de ebullición, brevemente se colocó una asada de la muestra bacteriana en 200 μ l de agua estéril, la cual se sometió a una temperatura de 92°C durante 15 minutos, se centrifugó a 6000 *g* durante 15 minutos, y se tomaron 5 μ l del sobrenadante que se utilizó como template de ADN en la mezcla para PCR.

Tipificación capsular por PCR

Los tipos capsulares se determinaron por medio de una PCR múltiple, tomando como base el protocolo descrito por Townsend *et al.*,¹³ para la amplificación de los genes *hyaD-hyaC* y *dcbF*.

Se colocaron 32.5 μ l de agua destilada estéril, 5 μ l de amortiguador 1 $\times$ PCR, 3 μ M MgCl₂, 1.6 μ M de dNTP'S, 3.6 μ M de cada uno de los iniciadores, 5 μ l de ADN y 2.5 U de Taq ADN Polimerasa,** la amplificación se realizó en un termociclador*** bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 56.5°C por 30 seg y extensión a 72°C durante 30 seg por 30 ciclos. La extensión final se realizó a 72°C por 5 min para amplificar los genes *hyaD-hyaC* para el SA y el gen *dcbF* para el SD. La visualización de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa a 1% teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 KB Plus (Invitrogen). El tamaño del producto de amplificación para el SA fue de 1,044 pb y para el SD de 657 pb. En cada PCR múltiple se utilizaron cepas de referencia de *P. multocida* SA y *P. multocida* SD y como testigo negativo se utilizó una cepa de *E. coli* DH5 α .

*BD Bioxon, Becton Dickinson. México.

**Invitrogen. Ventura California, USA.

***PCR express Termo, Termo Hybaid. Waltham, MA.

Results

Identification of strains by API 20NE

According to Web API software established values, 250 *P. multocida* strains were identified, from which 97.2% (243/250) showed an identification percentage of 96%, and typing 1 of *P. multocida*; 2.8% (7/250) showed 87.2% of identification and typing 0.72 of *P. multocida*.

Capsular typing

Global results by hyaluronidase test showed that 90.4% (226/250) of strains was AS and by acriflavine test, 9.6% (24/250) was DS.

According to the origin region, the identification percentage in the dairy complex of TZY was 80.25% (65/81) for AS and 19.75% (16/81) for DS, of RLA, 95.26% (161/169) for AS and 4.74% (8/169) for DS (Table 1).

In relation to the physical condition of the clinically healthy animals 91.76% (167/182) was AS and 8.24% (15/182) DS, in clinically ill 86.76% (59/68) was AS and 13.24% (9/68) DS (Table 1).

Molecular typing

By PCR test, genes *hyaD-hyaC* were amplified for AS and gene *dcfF* for DS whose amplification products had an expected molecular weight of 1 044 pb for SA and 657 pb for DS (Figure 1).

By means of the multiplex PCR, the global results were 92% (230/250) AS and 8% (20/250) DS. According to the origin region, in TZY, 100% (81/81) was AS and in RLA, 88.16% (149/169) AS and 11.84% (20/169) DS. According to the physical condition, in clinically healthy animals, 91.2% (166/182) was AS and 8.8% (16/182) was DS. In clinically ill bovines, 94.11% (64/68) was AS and 5.89% (4/68) DS (Table 2).

Concordance evaluation

The concordance of hyaluronidase and acriflavine tests was evaluated with the multiplex PCR. The specific concordance between hyaluronidase test and PCR test was 90% and the absolute concordance was 98%; the specific concordance between the acriflavine test and PCR test was 8%, and the absolute concordance was 98%. The concordance between the biochemical and PCR tests and Kappa test, showed an almost perfect concordance, equal to 0.9% and a value of $P = 0.0001$, with a confidence interval of 95%.

Análisis estadístico

Se realizó con el Programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados versión 3.0 (EPIDAT), Organización Panamericana de Salud (OPS/OMS) 2003.

Con los datos obtenidos se calcularon las frecuencias de los tipos capsulares (A y D) identificados en cada uno de los grupos según la identificación capsular o molecular.

La determinación de la concordancia entre los resultados de las pruebas de PCR y los resultados de las pruebas de hialuronidasa y acriflavina, se llevó a cabo mediante el cálculo de la concordancia absoluta y la concordancia específica y la prueba de Kappa.^{14,15}

Resultados

Identificación de cepas mediante API 20NE

De acuerdo con los valores establecidos por el software API WEB, se lograron identificar 250 cepas de *P. multocida*, de las cuales 97.2% (243/250) mostró un porcentaje de identificación de 96%, y una tipicidad de 1 a *P. multocida*; 2.8% (7/250) presentaron 87.2% de identificación y 0.72 de tipicidad a *P. multocida*.

Tipificación capsular

Los resultados globales mediante la prueba de hialuronidasa mostraron que 90.4% (226/250) de las cepas fue SA y por medio de la prueba de acriflavina, 9.6% (24/250) fue SD.

De acuerdo con la región de origen, el porcentaje de identificación en la cuenca lechera de TZY fue de 80.25% (65/81) para el SA y 19.75% (16/81) para el SD, para la RLA, 95.26% (161/169) fue SA y 4.74% (8/169) SD (Cuadro 1).

En relación con el estado de salud en los animales clínicamente sanos 91.76% (167/182) fue SA y 8.24% (15/182) SD, en los clínicamente enfermos 86.76% (59/68) fue SA y 13.24% (9/68) SD (Cuadro 1).

Tipificación molecular

Mediante la prueba de PCR se amplificaron los genes *hyaD-hyaC* para el SA y el gen *dcfF* para el SD cuyos productos de amplificación tuvieron un peso molecular esperado de 1044 pb para el SA y de 657 pb para el SD (Figura 1).

Por medio de la PCR múltiple los resultados globales fueron de 92% (230/250) SA y 8% (20/250) SD. De acuerdo a la región de origen, en TZY el 100% (81/81) fue SA y en la RLA el 88.16% (149/169) SA y 11.84% (20/169) SD. De acuerdo con el estado

Discussion

Respiratory pathologies represent great economical losses in the bovine industry of the country; therefore, it is relevant to identify and characterized the etiological agents implicit in this disease, in order to carry out the adequate diagnosis, treatment and prevention measures.¹⁶ Worldwide, the main bacterial agents involved in respiratory problems in cattle are *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Histophilus somni*.⁹ In Mexico, *P. multocida* types A and D have been identified as responsible to cause pneumonic pastereullosis in bovines.¹⁷⁻¹⁹

Alternative methods are available for the biochemical identification of *P. multocida*, which are

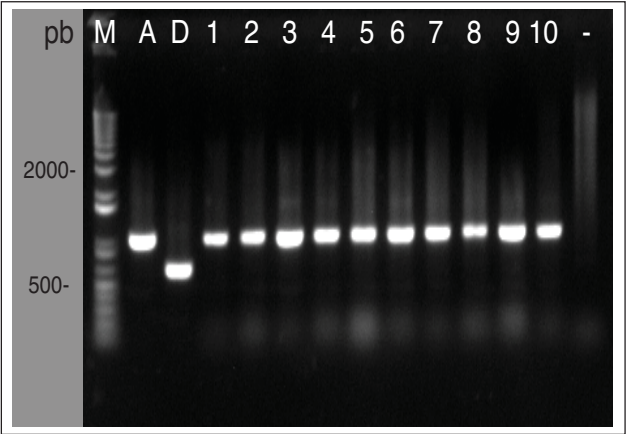


Figura 1. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, que muestra los productos de amplificación de la PCR múltiple a partir de muestras de exudado nasal de bovinos. (M): marcador, (A): testigo A, (D) testigo D, carriles 1-10 cepas de campo, (-) testigo negativo.

Figure 1. Agarose gel at 1%, stained with ethidium bromide, which shows the amplified products of multiplex PCR from cattle nasal exudate samples. (M): marker, (A): control A, (D) control D, field strain lanes 1-10, (-) negative control.

de salud, en los animales clínicamente sanos 91.2% (166/182) fue SA y 8.8% (16/182) fue SD. Entre los bovinos clínicamente enfermos, 94.11% (64/68) fue SA y 5.89% (4/68), SD (Cuadro 2).

Evaluación de la concordancia

Se evaluó la concordancia de las pruebas de hialuronidasa y acriflavina con la PCR múltiple. La concordancia específica entre la prueba de hialuronidasa y la prueba de PCR fue de 90% y la concordancia absoluta, de 98%; la concordancia específica entre la prueba de acriflavina y la prueba de PCR fue de 8%, y la concordancia absoluta, de 98%. La concordancia entre las pruebas bioquímicas y la PCR con la prueba de Kappa, mostró una concordancia casi perfecta, igual a 0.9% y un valor de P de 0.0001, con un intervalo de confianza de 95%.

Discusión

Las patologías respiratorias representan grandes pérdidas económicas en la industria bovina en el país, por ello es relevante identificar y caracterizar los agentes etiológicos implicados en esta enfermedad, para así poder aplicar las medidas de diagnóstico, tratamiento y prevención adecuadas.¹⁶ A nivel mundial, los principales agentes bacterianos involucrados en problemas respiratorios en el ganado bovino son *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*.⁹ En México, se han identificado los tipos capsulares de *P. multocida* A y D como los responsables de ocasionar la pasteurellosis neumónica en los bovinos.¹⁷⁻¹⁹

Para la identificación bioquímica de *P. multocida* se dispone de métodos alternativos, los cuales se basan en sistemas comerciales que facilitan y agilizan la identificación, entre los cuales se encuentra el

Cuadro 1

Tipos capsulares mediante las pruebas de hialuronidasa y acriflavina, de cepas de *P. multocida* obtenidas de exudado nasal de bovinos, según origen y estado de salud, en Tizayuca y Región Lagunera, México

Capsular types by means of hialuronidase and acriflavine tests, of *P. multocida* strains obtained from cattle nasal exudates, according to their origin and physical condition, in Tizayuca and Region Lagunera, Mexico

Capsular type	Global	Origin		Physical condition	
		TZY	RLA	Healthy	Ill
A	90.40% (226/250)	80.25% (65/81)	95.26% (161/169)	91.76% (167/18)	86.76% (59/68)
D	9.60% (24/250)	19.75% (16/81)	4.75% (8/169)	8.24% (15/182)	13.24% (9/68)

Cuadro 2

Tipos capsulares mediante PCR múltiple, de cepas de *P. multocida* obtenidas de exudado nasal de bovinos, según origen y estado de salud.
Tizayuca y Región Lagunera, México

Capsular types by means of multiplex PCR, of *P. multocida* strains obtained from cattle nasal exudates, according to their origen and physical condition, in Tizayuca and Region Lagunera, Mexico

Capsular type	Global	Origin		Physical condition	
		TZY	RLA	Healthy	Ill
A	92.00% (230/250)	100.00% (81/81)	88.16% (149/169)	91.20% (166/182)	94.11% (64/68)
D	8.00% (20/250)	0.00% (0/81)	11.84% (20/169)	8.80% (16/182)	5.89% (4/68)

based on commercial systems that facilitate and speed up identification, among them there is API 20NE system for Gram-negative bacillus, non-enterobacteria and non-API 20NE demanding, which has demonstrated to be easy to apply and highly trustworthy for the identification of genus and bacterial species, and that it has been satisfactorily used in *P. multocida* and *M. haemolytica* isolates.²⁰ The results obtained by this system showed a high percentage of identification and complete typing of *P. multocida* in all isolates. There were no differences between healthy and ill animals.

Several authors^{21,22} have used the biochemical tests of hyaluronidase and acriflavine for the phenotypic characterization of *P. multocida* strains. They report that they are a useful tool, easy to apply, that decreases many of the present problems in the identification by indirect hemoagglutination test, but also present problems related with its limited certainty, mixed results and culture conditions that influence in the expression of some phenotypic characteristics of these strains, being able to present negative or positive false results, besides requiring technical personnel with ample experience in the development and interpretation of these techniques.

The frequencies in capsular identification by these tests differ in all the world, and according to some authors the main capsular type found in pneumonic problems is A, with percentages that may go from 80 to 100%. Similar studies have been done in ovines, caprines, swine and birds around the world, where the most frequently found capsular type is A, with a percentage that goes from 77 to 97.3%, while from DS the range is from 0.02 up to 27%.^{23,24}

The results found in the present study (AS 90.4% and DS 9.6%), where AS predominates, are similar to the ones recorded by other authors in the country. Garcia *et al.*,²⁵ from nasal exudates they found 100% of AS, while from pneumonic lungs Blanco *et al.*²⁶ recorded

sistema API 20NE para bacilos Gram negativos, no enterobacterias y no exigentes, que ha demostrado ser un método de fácil aplicación y de alta confiabilidad para la identificación del género y la especie bacteriana, y que ha sido usado satisfactoriamente en aislamientos de *P. multocida* y *M. haemolytica*.²⁰ Los resultados obtenidos por medio de este sistema mostraron un alto porcentaje de identificación y una tipicidad completa a *P. multocida* en todos los aislamientos. No se presentaron diferencias entre los grupos de animales sanos y enfermos.

Diversos autores^{21,22} han utilizado las pruebas bioquímicas de hialuronidasa y acriflavina para la caracterización fenotípica de cepas de *P. multocida*. Ellos mencionan que son una herramienta útil, de fácil realización, que disminuye muchos de los problemas presentes en la identificación mediante la prueba de hemoagglutinación indirecta, pero también presentan problemas relacionados con su limitada certeza, la confusión de resultados y las condiciones de cultivo que influyen en la expresión de algunas de las características fenotípicas de estas cepas, pudiendo presentar resultados falsos negativos o falsos positivos, además de requerir de personal técnico con amplia experiencia en la realización e interpretación de estas técnicas.

Las frecuencias en la identificación capsular mediante estas pruebas son muy variadas en todo el mundo, y según algunos autores el principal tipo capsular encontrado en problemas neumónicos es el A, con porcentajes que pueden ir desde 80 hasta el 100%. Trabajos similares se han realizado en ovinos, caprinos, cerdos y aves alrededor del mundo, donde el tipo capsular más frecuentemente encontrado es el A, con porcentajes que van desde 77 hasta 97.3%, mientras que del SD el rango es de 0.02 hasta 27%.^{23,24}

Los resultados encontrados en el presente trabajo (SA 90.4% y SD 9.6%), en los que predomina el SA, son

61% for AS, 25% DS and 14% of non-typing strains; Jaramillo *et al.*¹⁸ obtained 100% of strains belonging to AS, and Jaramillo *et al.*¹⁹ from pneumonic lungs found 98.7% for AS and 1.2% for capsular type D.

Several authors have used different molecular techniques such as ribotyping and PCR, since they allow the clearly detection of genetic variances between strains. Due to its versatility, PCR may be useful for routine diagnosis of pasteurellosis in different species and in the development of epidemiological studies, without recurring to phenotypic tests, which can take several days before obtaining a result.^{23,27-29}

Studies performed, using PCR for molecular identification of *P. multocida* capsular types in isolates of bovine origin, record high identification percentages for AS that go from 92.3 to 99%, these results are similar to the findings in this work, where 92% of isolates corresponded to AS.^{30,31} In Mexico there are no published data where PCR is used for the identification of *P. multocida* capsular types.

There are no significant differences between the isolates of the two capsular types in the dairy complex study. This may be due to the homogenous behavior that these capsular types show around the world and the country.

The comparison of the results between the biochemical tests (hyaluronidase and acriflavine) and the PCR technique concord with the identification of AS, but not so with DS, since there are 20 identified strains as DS by these biochemical tests, and by PCR there were AS; this can be due to the problems encountered by phenotypic tests, in which the culture conditions may influence the expression of the phenotypic attributes such as morphology, carbohydrate fermentation and serological properties; likewise, *P. multocida* strains present three variants: mucoid, iridescent lysis and non-iridescent lysis, all of that can generate confusion in the identification of this organism.^{9,32,33}

It is assumed that, similar to other countries of Europe and America, in Mexico the predominant capsular type of *P. multocida* in bovines is type A.

The biochemical techniques and PCR test showed differences in the identification of *P. multocida* capsular types, the strains identified as DS are really AS, this is due to the subjectivity of the biochemical tests that are influenced by the presentation of phenotypic characteristics that may vary from one strain to the other.

Acknowledgements

Special thanks to the UNAM, for the support granted to this research through PAPIIT, project IN208708 and to Conacyt, project CB104031. To the Departamento de Microbiología e Inmunología and Medicina Preventiva

similares a los registrados por otros autores en el país. García *et al.*,²⁵ a partir de exudado nasal encontraron 100% de cepas SA, mientras que a partir de pulmones neumónicos Blanco *et al.*²⁶ registraron 61% para el SA, 25% SD y 14% de cepas no tipificables; Jaramillo *et al.*¹⁸ obtuvieron 100% de cepas pertenecientes a SA, y Jaramillo *et al.*¹⁹ a partir de pulmones neumónicos encontraron 98.7% para el SA y 1.2% para el tipo capsular D.

Diversos autores han empleado distintas técnicas moleculares como la ribotipificación y la reacción en cadena de la polimerasa, ya que permiten detectar con claridad las variaciones genéticas entre las cepas. Debido a su versatilidad, la PCR puede ser útil para el diagnóstico de rutina de la pasteurellosis en las diferentes especies y en la realización de estudios epidemiológicos, sin tener que recurrir a las pruebas fenotípicas, las cuales pueden llevar varios días antes de obtener un resultado.^{23,27-29}

Estudios realizados, utilizando la PCR para la identificación molecular de los tipos capsulares de *P. multocida* en aislamientos de origen bovino, registran elevados porcentajes de identificación para el SA, que van de 92.3 a 99%, estos resultados son similares a los hallazgos de este trabajo, en los que 92% de los aislamientos correspondieron a SA.^{30,31} En México no existen datos publicados en los cuales se utilice la prueba de PCR para la identificación de los tipos capsulares de *P. multocida*.

No existen diferencias significativas entre los aislamientos de los dos tipos capsulares en los complejos lecheros estudiados. Esto puede deberse al comportamiento tan homogéneo que presentan estos tipos capsulares alrededor del mundo y del país.

La comparación de los resultados entre las pruebas bioquímicas (hilauronidasa y acriflavina) y la técnica de PCR concuerdan en la identificación de las cepas del SA pero no así con las del SD, ya que existen 20 cepas identificadas como SD mediante estas pruebas bioquímicas, que por medio de la PCR fueron SA; esto puede deberse a los problemas que enfrentan las pruebas fenotípicas, en las que las condiciones del cultivo puede influenciar la expresión de los atributos fenotípicos como la morfología, fermentación de carbohidratos y propiedades serológicas, asimismo las cepas de *P. multocida* presentan tres variantes: mucoides, lisas iridiscentes y lisas no iridiscentes, todo ello puede generar confusión en la identificación de este organismo.^{9,32,33}

Se corrobora que, de manera similar a otros países de Europa y América, en México el tipo capsular predominante de *P. multocida* en bovinos es el tipo A.

Las técnicas bioquímicas y la prueba de PCR mostraron diferencias en la identificación de los tipos capsulares de *P. multocida*, las cepas identificadas como

y Salud Publica of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia for their support and considerations granted for the achievement of this work.

Referencias

- HOLTH JB, KRIEG NR, SNEATH HAP, STANLEY JT, WILLIAMS T. Bergen's Manual of the determinative Bacteriology. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2000.
- BLACKALL PJ, MIFLIN JK. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. Avian Pathol 2000; 29: 271-287.
- HARPER M, BOYCE JD, ADLER B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol Lett 2006; 265: 1-10.
- CARTER GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. Adv Vet Sci 1967: 321-379.
- BOYCE JD, Lo RYC, WILKIEL L, ADLER B. *Pasteurella* and *Mannheimia*. In: GYLES CL, PRESCOTT JF, THOEN CO, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animal. Carlton Australia: Blackwell publishing, 2004: 273-294.
- CHRISTENSEN H, KUHNERT P, BUSSE JH, FREDERIKSEN CW, BISGAARD M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57: 66-78.
- TRIGO FJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. Cien Vet 1987; 4: 1-37.
- TRIGO TFJ. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteuriosis pulmonar bovina. Vet Méx 1991; 22: 131-34.
- JACQUES M, BÉLANGER M, DIARRA MS, DARGIS M, MALOUIN F. Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and *in vivo*. Microbiology 1994; 140: 263-70.
- HUNT ML, ADLER B, TOWNSEND KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 2000; 72: 3-25.
- CARTER GR, SUBRONOTO P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavin. Am J Vet Res 1973; 34: 293-294.
- CARTER GR, RUNDELL SW. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. Vet Rec 1975; 96:343.
- TOWNSEND KM, BOYCE JD, CHUNG JY, FROST AJ, ADLER B. Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. J Clin Microbiol 2001; 39: 924-929.
- MERINO CE. Observaciones y mediciones. En: MORENO AL, CANO VF, GARCÍA RH, editores. Epidemiología clínica, México DF: McGraw Hill Interamericana, 1994: 80-83.
- DEVER GEA. Epidemiología y administración de servicios de salud. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de Salud. 1991.
- CANO CJP. Clasificación clínica y tratamientos del complejo respiratorio bovino. Bovinotecnia [Serie

SD son verdaderamente SA, esto se debe a la subjetividad de las pruebas bioquímicas que se encuentran influenciadas por la presentación de las características fenotípicas que pueden variar de una cepa a otra.

Agradecimientos

Se agradece a la UNAM, mediante el proyecto PAPIIT IN208708 y al Conacyt a través del proyecto CB104031, por el apoyo brindado a este trabajo. A los Departamentos de Microbiología e Inmunología y Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

en línea: 2007 mayo] [Citado 2010, noviembre, 01] Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgCliC003.htm>

- WELSH RD, DYE LB, PAYTON ME, CONFER AW. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1991-2002. J Vet Diagn Invest 2004; 16: 426-431.
- JARAMILLO ML, AGUILAR RF, TRIGO TFJ. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros de México. Vet Méx 1987; 18: 185-88.
- JARAMILLO ACJ, HERNANDEZ CR, CAMPUZANO OVM, SUAREZ GF, DELGADO GR, TRIGO TF. Characterization of *Mannheimia* Sp. and *P. multocida* Strains Isolate from Bovine Pneumonic Lungs in Two Slaughterhouses in Mexico. J Anim Vet Adv 2007; 6: 1398-1404.
- HAYASHIMOTO N, AIBA T, ITOH K. Identification procedure for *Pasteurella pneumotropica* in microbiologic monitoring of laboratory animals. Exp Anim 2005; 54: 123-129
- CHENGAPPA MM, CARTER GR, BAILE EW. Identification of type D *Pasteurella multocida* by counterimmunoelectrophoresis. J Clin Microbiol 1986; 24: 721-23.
- CATRY B, BAELE M, OPSOMER G, KRUIF A, DECOSTERE A, HAESBROUCK F. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. Vet Microbiol 2004; 98: 251-260.
- BLACKALL PJ, PAHOFF JL, BOWLES R. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. Vet Microbiol 1997; 57: 357-360.
- TOWNSEND KM, BOYCE JD, CHUNG JY, FROST AJ, ADLER B. Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. J Clin Microbiol 2001; 39: 924-929.
- GARCÍA HE, TRIGO TFJ, SÁNCHEZ-MEJORADA PH, AGUILAR RF. Serotipos de *Pasteurella multocida* en bovinos productores de carne en México. Vet Méx 1988; 19: 199-201.
- BLANCO VFJ, TRIGO FJ, JARAMILLO LM, AGUILAR

- RF. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumatic lesions in cattle and sheep from Mexico. Lat Am Microbiol 1995; 37: 121-126.
27. SHIVACHANDRA SB, KUMAR AA, CHAUDHURI P. Molecular characterization of Avian strains of *Pasteurella multocida* serogroup-A:1 based on amplification of repetitive regions by PCR. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2008; 31: 47:62
 28. KALOREY DR, YUVARAJ S, VANJARI SS, GUNJAL PS, DHANAWADE NB, BARBUDDHE SB *et al.* PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2008; 31: 459-65.
 29. EWERS C, LÜBKE-BECKER A, BETHE A, KIEBLING S, FILTER M, WIELER LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet Microbiol 2006; 114: 304-317.
 30. DAVIES LR, MACCORQUODALE R, REILLY S. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. Vet Microbiol 2004; 99: 145-58.
 31. DEROSA CD, MECHOR DG, STAATS JJ, CHENGAPPA MM, SHRYOCK RT. 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: 327-32.
 32. CARTER GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. Adv Vet Sci 1967; 4: 321-379.
 33. HUNT ML, ADLER B, TOWNSEND KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 2000; 72: 3-25.