

Caracterización de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos productores de carne clínicamente sanos en el estado de Querétaro

Characterization of capsular types of *Pasteurella multocida* isolated from clinically healthy beef cattle pharyngeal exudate in the state of Querétaro

Ana Lilia Villegas Vázquez† Víctor Manuel Campuzano-Ocampo* Rigoberto Hernández-Castro**
Francisco Suárez-Güemes*** Francisco José Trigo Tavera† Carlos Julio Jaramillo-Arango‡

Abstract

The objective of the present study was to identify and characterize capsular types of *P. multocida* isolated from beef cattle pharyngeal exudate in the state of Querétaro. Two hundred and twenty seven pharyngeal exudate swab samples from clinically healthy animals in a slaughterhouse in the municipality of Ezequiel Montes, Querétaro were obtained. Samples were seeded in blood agar and incubated at 37°C for 24 h under aerobiosis. Strains were identified through morphological characteristics, conventional biochemical tests and commercial API 20NE Micro-System. Capsular typing of groups A and D was performed by a multiplex PCR for amplification of genes *hyaD-hyaC* and *dcbF*, respectively. According to the values established by API WEB software, it was possible to identify 14.09% (32/227) of *P. multocida* strains, which showed an identification percentage of 96% and a typicality of 1 to *P. multocida*. By multiplex PCR, the amplification of genes *hyaD-hyaC*, correspondent to capsular group A in 100% (32/32) of the strains previously identified as *P. multocida*, was achieved. There are no similar data in Mexico on the identification and characterization of *P. multocida* in beef cattle. With the results obtained it is confirmed that, in a similar way with other countries of Europe and America, capsular type A of *P. multocida* is predominant in Mexico.

Key words: *PASTEURELLA MULTOCIDA*, CAPSULAR TYPES, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION, PHARYNGEAL EXUDATE, CATTLE, PCR.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar los tipos capsulares de *P. multocida* en exudado faríngeo de bovinos destinados a la producción de carne en el estado de Querétaro. Se obtuvieron, mediante hisopo, 227 muestras de exudado faríngeo de animales clínicamente sanos en una planta de sacrificio ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro. Las muestras se sembraron en agar sangre y se incubaron a 37°C por 24 h en aerobiosis. Las cepas aisladas fueron identificadas mediante características morfológicas, pruebas bioquímicas convencionales y el microsistema comercial API 20NE. La tipificación de los grupos capsulares A y D se realizó por medio de una PCR múltiple para la amplificación de los genes *hyaD-hyaC* y *dcbF*, respectivamente. De acuerdo con los valores establecidos por el software API WEB, se logró la identificación de 14.09% (32/227) de cepas de *P. multocida*, que mostraron 96% de identidad y una tipicidad de 1 a *P. multocida*. Por medio de la PCR múltiple se logró la amplificación de los genes *hyaD-hyaC* correspondientes al grupo capsular A en el 100% (32/32) de las cepas identificadas previamente como *P. multocida*. No existen datos similares en

Recibido el 19 de junio de 2013 y aceptado el 4 de septiembre de 2013.

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

†Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

‡Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano CEIEPAA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Km. 8.5 Carretera Tequisquiapan, Ezequiel Montes, Tequisquiapan, Querétaro.

Autor de correspondencia: Carlos Julio Jaramillo Arango, Correo electrónico: jaramillo50@yahoo.com.mx Tel. 014142918100

Nota: Este trabajo es parte de la tesis de licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia del primer autor.

México sobre la identificación y caracterización de *P. multocida* en bovinos destinados a la producción de carne. Con los resultados obtenidos se corrobora que, de manera similar a otros países de Europa y América, en México el grupo capsular predominante de *P. multocida* es el A.

Palabras clave: *PASTEURELLA MULTOCIDA*, TIPOS CAPSULARES, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, EXUDADO FARÍNGEO, BOVINOS, PCR.

Introducción

Bovine respiratory disease complex (BRD) consists of three clinical entities: enzootic pneumonia of calves, interstitial pneumonia and pneumonic pasteurellosis in cattle; this last is described as an acute course disease that affects young and adult cattle, in which microorganisms of the Pasteurellaceae family, such as: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and *Histophilus somni* are involved, as well as other agents, such as infectious bovine rhinotracheitis virus (IBR), among others.^{1,2}

The main pathogens present in BRD are part of the normal microbiota of the respiratory tract in beef cattle. *P. multocida* is one of the main microorganisms isolated from BRD, as well as *M. haemolytica*. When stressful conditions or viral infections exist, these microorganisms normally colonize the nasopharynx of several domestic and wild animals.^{3,4}

P. multocida is subdivided into four subspecies, which include *Pasteurella multocida* subspecies *multocida*, *gallicida*, *septica* and *tigris*. *P. multocida* can be classified into five capsular groups: A, B, D, E and F, based on different polysaccharides of the capsule.⁵⁻⁷

The geographic distribution of these groups varies, groups B and E cause hemorrhagic septicemia that affects the water buffalo and cattle in Asia, Africa and south of Europe. It has been demonstrated that capsular groups A and D affect cattle in Mexico. Prevalence determination contributes to the elaboration of biological products for prevention and control of pneumonic pasteurellosis.^{6,7}

The diagnosis of diseases caused by *P. multocida* has been traditionally based on identification of clinical signs and physiochemical characteristics of the agent. These tests are carried out based on phenotypic qualities; however, culture conditions may have an influence on the expression of some characteristics, such as morphology, carbohydrate fermentation and serological properties and therefore decrease the sensitivity and specificity of the methods based on these characteristics.⁸

In recent years, molecular biological techniques have given great benefits for bacterial identification overcoming the limitations of conventional procedures. The assays based on the detection of nucleic acids enable the detection of organisms directly from

Introducción

El complejo respiratorio bovino (CRB) está conformado por tres entidades clínicas: neumonía enzootica de los terneros, neumonía intersticial y la pasteurellosis neumónica bovina; ésta última se describe como una enfermedad de curso agudo que afecta a los bovinos jóvenes y adultos, en la cual se involucran microorganismos de la familia Pasteurellaceae, como *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni* y otros agentes como el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), entre otros.^{1,2}

Los principales patógenos presentes en el CRB son parte de la microbiota normal de las vías respiratorias de los bovinos de engorda. *P. multocida* es uno de los principales microorganismos aislados dentro del CRB, al igual que *M. haemolytica*. Estos microorganismos colonizan normalmente la nasofaringe de diversos animales domésticos y silvestres, cuando existen condiciones de tensión (estrés) o bien en infecciones virales.^{3,4}

P. multocida se subdivide en cuatro subespecies, que incluye a *Pasteurella multocida* subs *multocida*, *gallicida*, *septica* y *tigris*. *P. multocida* se puede clasificar en cinco grupos capsulares: A, B, D, E y F, basándose en los diferentes polisacáridos de la cápsula.⁵⁻⁷

La distribución geográfica de estos grupos es variable, los grupos B y E producen la septicemia hemorrágica, que afecta a los búfalos de agua y al ganado bovino en Asia, África y sur de Europa. Se ha demostrado que los grupos capsulares A y D afectan al ganado bovino en México. La determinación de la prevalencia contribuye a la elaboración de productos biológicos para la prevención y control de la pasteurellosis neumónica.^{6,7}

El diagnóstico de las enfermedades producidas por *P. multocida* se basa en los signos clínicos y características fisicoquímicas del agente. Estas pruebas se realizan con base en cualidades fenotípicas; sin embargo, las condiciones del cultivo pueden influir en la expresión de algunas características, como la morfología, fermentación de carbohidratos y propiedades serológicas, y con ello disminuir la sensibilidad y especificidad de los métodos basados en estas características.⁸

En años recientes, las técnicas de biología molecular han significado grandes beneficios para la identificación bacteriana, superando algunas limitaciones de los procedimientos convencionales. Los ensayos basados en la detección de los ácidos nucleicos permiten la de-

clinical samples and thus sensitivity, specificity and time required for identification of the microorganism improves. PCR, in particular, has been useful, because by using specific primers it is easy to identify the genus and the capsular groups.^{8,9}

In Mexico there are previous studies on characterization and prevalence of *P. multocida* capsular types in dairy cattle, but none have been carried out in beef cattle; therefore, the objectives of this study were to identify the different capsular types and estimate the frequency of *Pasteurella multocida* in clinically healthy beef cattle pharyngeal exudate.

Material and methods

Sampling design

A prevalence of 18% was considered based on previous studies¹⁰ and the minimum sample size (MSS) was calculated with 95% confidence and 5% estimated error.

The following equation was used: $n = z^2 \times p \times q / d^2$, in which $z = 95\%$ confidence level = 1.96; p = probability that an event or prevalence will occur; $q = 1 - p$, probability that an event will not occur; d = estimated error. Based on this equation, 227 bovines was the MSS for obtaining the ratio of animals positive for *P. multocida*.

Collection and type of study samples

Bovines were sampled at the slaughterhouse of the Distribuidora de Carne del Bajío (DICABSA), located in the municipality of Ezequiel Montes, Querétaro; these animals were sampled after slaughter and before washing. Pharyngeal exudate samples were collected using sterile swabs, placed in Stuart's transport medium and kept in refrigeration until processing at the Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública Veterinaria in the Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, FMVZ-UNAM.

Isolation and identification of *P. multocida*

Isolation and identification of colonies was carried out by inoculation of blood agar plates from pharyngeal exudate swabbings; they were incubated under aerobiosis for 24 hours at 37°C. Later, Gram staining was performed. The morphological characteristics of the colonies were observed and those consistent with *P. multocida* were selected: round, gray, mucoid and without hemolysis. Catalase and oxidase identification tests were conducted. A new inoculation was performed

tección de organismos directamente de las muestras clínicas, así se mejora la sensibilidad, la especificidad y el tiempo requerido para la identificación del microorganismo. Particularmente la PCR ha sido muy útil, pues con el uso de iniciadores específicos resulta fácil la identificación del género y los grupos capsulares.^{8,9}

No obstante que en México se cuenta con estudios previos sobre la caracterización y prevalencia de los tipos capsulares de *P. multocida* en bovinos destinados a la producción de leche, aún no se han realizado estudios en bovinos destinados a la producción de carne; por tal motivo, los objetivos de este estudio fueron: identificar los diferentes tipos capsulares y estimar la frecuencia de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos clínicamente sanos destinados a la producción de carne.

Material y métodos

Diseño del muestreo

Se consideró una prevalencia de 18% con base en estudios previos¹⁰ y se calculó el tamaño mínimo de muestra (TMM) con 95% de confianza y un error estimado de 5%.

Se aplicó la siguiente ecuación: $n = z^2 \times p \times q / d^2$, en la que z = nivel de confianza al 95% = 1.96; p = probabilidad de que ocurra el evento o prevalencia; $q = 1 - p$, probabilidad de que no ocurra el evento; d = error estimado. Con base en dicha ecuación, el TMM fue de 227 bovinos, para determinar la proporción de animales positivos a *P. multocida*.

Obtención y tipo de muestras de estudio

La obtención de las muestras se llevó a cabo en la planta de sacrificio tipo inspección federal (TIF) de la Distribuidora de Carne del Bajío (DICABSA), ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro, en bovinos provenientes del mismo municipio; dichos animales fueron muestreados después del sacrificio y antes del lavado de las cabezas. Se recolectaron muestras de exudado faríngeo mediante hisopos estériles que se colocaron en medio de transporte Stuart y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento, el cual se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública Veterinaria y en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, FMVZ- UNAM.

with the aim to obtain strains of pure *P. multocida* culture and then, biochemical identification was performed using a commercial microsystem.

Biochemical identification of *P. multocida*

Biochemical identification of *P. multocida* strains was carried out using the API 20NE system.* The colonies, incubated for 18 to 24 hours in 5% blood agar, were tested. The reaction reading was carried out using the identification table provided by the manufacturer; identification was done with a numerical profile and recognition by using the online identification software (APIWEB).

Molecular characterization of capsular groups of *P. multocida*

DNA extraction

The strains identified as *P. multocida* by the API20NE system were re-seeded on to 5% blood agar and incubated at 37°C for 24 hours. DNA extraction was done by the thermal shock method.¹¹ A loop of bacterial sample was suspended in 200 µl of distilled sterile water and was subjected to a temperature of 92°C (boiling) for 15 minutes. It was centrifuged at 8000 × g for 15 minutes and 5 µl of supernatant (DNA) were added to the PCR mix.

PCR

The amplified genes for characterization of capsular types were: for A, *hyaD-hyaC* encoding the synthesis of hyaluronic acid by means of primers 5'-TGCCA-AAATCGCAGTCAG-3' and 5'-TTGCCATCATTGT-CAGTG-3' and for capsular group D, *dcbF* encoding the synthesis of a glycosyl transferase of the capsular operon, for which the primers used were: 5'-TTACA-AAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' and 5'-CATCTACCACTCAATATCAG-3'. Molecular characterization was done by multiplex PCR based on the protocol described by Campuzano *et al.*⁸ Amplification was done in a thermocycler* under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by denaturation at 95°C for 30 seconds, elongation at 56.5°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds using 30 cycles; final extension at 72°C for 5 minutes. The reactions were kept at 4°C until visualization. For the reactions to occur, 32.5 µl of distilled sterile water, 5 µl 1 x PCR buffer, 3 µl of MgCl₂, 2 µl of dNTPs, 0.5 µl of each primer, 5 µl of DNA and 0.5 µl

Aislamiento e identificación de *P. multocida*

El aislamiento e identificación de las colonias se realizó por siembra en cajas de agar sangre a partir del hisopo, se incubaron en aerobiosis durante 24 h a 37°C. Posteriormente se realizó la tinción de Gram. Se observaron las características morfológicas de las colonias y se seleccionaron aquellas que coincidieron con las de *P. multocida*: redondas, grises, mucoides y sin presencia de hemólisis. Posteriormente se llevaron a cabo las pruebas de identificación de catalasa y oxidasa. Se realizó una nueva siembra con el fin de obtener cultivo puro de las cepas de *P. multocida*, y posteriormente se llevó a cabo la identificación bioquímica mediante un microsistema comercial.

Identificación bioquímica de *P. multocida*

Se realizó la identificación bioquímica de las cepas de *P. multocida* mediante el sistema API 20NE*. Las pruebas se efectuaron a partir de colonias incubadas durante 18 y hasta 24 h en agar sangre al 5%. La lectura de las reacciones se realizó utilizando la tabla de identificación provista por el fabricante, la identificación se hizo con un perfil numérico, y el reconocimiento, mediante el software de identificación en línea (APIWEB).

Caracterización molecular de los grupos capsulares de *P. multocida*

Extracción de ADN

Las cepas identificadas como *P. multocida* mediante el sistema API 20NE se sembraron en agar sangre al 5% y se incubaron a 37°C durante 24 h. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el método de choque térmico.¹¹ Se suspendió una asada de la muestra bacteriana en 200 µl de agua destilada estéril, la cual se sometió a una temperatura de 92°C (ebullición) durante 15 minutos. Se centrifugó a 8000 g durante 15 minutos y se tomaron 5 µl del sobrenadante (ADN) para agregarlos a la mezcla de la PCR.

PCR

Para la caracterización de los tipos capsulares, los genes amplificados para el A fueron: *hyaD-hyaC*, que codifican para la síntesis de ácido hialurónico por medio de los iniciadores 5'-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3'

*BioMérieux sa F-69280 Marcy l'Etoile, Francia.

of Taq DNA polymerase were added. After amplification, the products were analyzed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide at 10% (10 mg/ml).

Results

Morphological identification of *P. multocida* strains

Of the 227 processed samples, 77 isolates recovered (33.92%) corresponded to *P. multocida* morphology (round, gray, mucoid and without hemolysis). Subsequently, they were Gram stained and 54 colonies (23.78%) corresponded to Gram-negative coccobacilli. Finally, oxidase and catalase tests were performed, resulting 50 positive isolates (22.02%).

Biochemical identification of strains by API 20NE

The 50 isolates, catalase positive and oxidase positive, were subjected to API 20NE microsystem for obtaining definitive biochemical identification with the following results: 64% (32/50) showed 96% of identification and typicality of 1 to *P. multocida*, and 24% (12/50) corresponded to *Pasteurella* spp, with an identification and typicality lower than 96% and 1, respectively.

Molecular typing

Genes *hyaD-hyaC* were amplified for capsular group A using PCR and gene *dcbF* for group D, whose amplification products had an expected molecular weight of 1044 bp for group A and 657 bp for group D (FIGURE 1). By means of multiplex PCR, it was possible to amplify a product of ~1044 bp in 100% of the strains (n = 32) that correspond to capsular group A of *P. multocida* (FIGURE 2).

Frequency of *P. multocida* in clinically healthy beef cattle

Based on the results obtained in biochemical and molecular identification, the estimated frequency of *P. multocida* was 14.09% (32/227), of which 100% (32/32) were group A.

Discussion

Bovine respiratory disease complex has great economic importance in cattle. Its confirmation is difficult because of the variety of clinical signs and the diagnostic procedures may last long. Bacterial agents are

y 5'- TTGCCATCATTGTCAGTG- 3', y para el grupo capsular D, el gen amplificado fue *dcbF*, que codifica para la síntesis de una glicosil transferasa del operón capsular, para lo cual se emplearon los iniciadores 5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' y 5'- CATC-TACCCACTCAATATCAG-3'. La caracterización molecular se realizó por medio de una PCR múltiple tomando como base el protocolo descrito por Campuzano *et al.*⁸ La amplificación se realizó en un termociclador* bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, elongación a 56.5°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos por 30 ciclos. La extensión final a 72°C por 5 minutos. Las reacciones se mantuvieron a 4°C hasta su visualización. Se colocaron 32.5 µl de agua destilada estéril, 5 µl de amortiguador 1x PCR, 3 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP'S, 0.5 µl de cada uno de los iniciadores, 5 µl de ADN y 0.5 µl de Taq ADN polimerasa. La visualización de los productos amplificados se efectuó en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio al 10% (10 mg/ml).

Resultados

Identificación morfológica de las cepas de *P. multocida*

De un total de 227 muestras procesadas, se recuperaron 77 aislados (33.92%) que correspondieron a la morfología de *P. multocida* (redondas, grisáceas, mucoides y sin presencia de hemólisis). Posteriormente se realizó la tinción de Gram, en donde 54 colonias (23.78%) correspondieron a coccobacilos Gramnegativos. Finalmente se utilizaron las pruebas de oxidasa y catalasa, con las que resultaron 50 aislamientos (22.02%) positivos.

Identificación bioquímica de las cepas mediante API 20NE

Los 50 aislados que resultaron positivos a los ensayos de catalasa y oxidasa fueron sometidos al microsistema API 20NE para obtener la identificación bioquímica definitiva, con los siguientes resultados: 64% (32/50) mostró 96% de identificación y tipicidad de 1 a *P. multocida*, y 24% (12/50) correspondió a *Pasteurella* spp, con una identificación y tipicidad menores a 96% y 1, respectivamente.

*MAXYGENE 198 Cambridge Street, Wembley WA 6014, Australia.

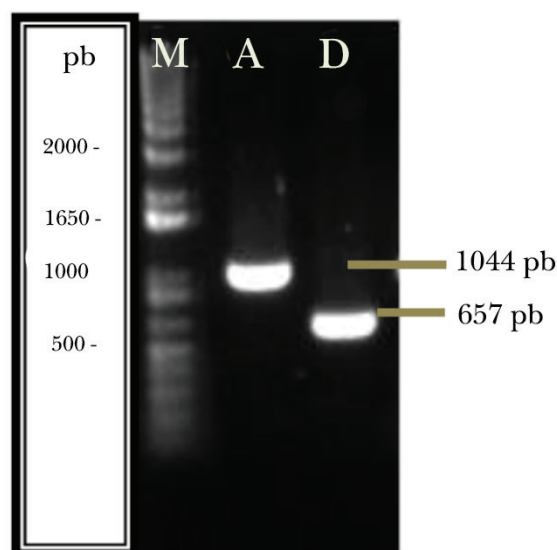


FIGURA 1. Producto de amplificación de PCR múltiple. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. (M) Marcador, (A) Cepa de referencia A, (D) Cepa de referencia D

FIGURE 1. Amplification product by multiplex PCR. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel. (M) Marker, (A) Reference strain A, (D) Reference strain D.

the pathogens most commonly involved; there is no effective and simple test to determine the etiology of the disease.^{1,11,12}

It has been demonstrated that the main bacteria found in respiratory problems in cattle are: *M. haemolytica*, *H. somni* and *P. multocida*, this last one is the bacterium most commonly isolated from pneumonia in dairy calves,^{14,15} which reflects, to some extent, the opportunist nature of the microorganism, overcoming the development of other bacteria.^{15,16}

Capsular groups A and D of *P. multocida* are responsible for causing pneumonic pasteurellosis in Mexico. In studies conducted in the country, it has been possible to isolate *Pasteurella* spp from lung samples obtained in slaughterhouses, in approximately 50% of the cases in which *P. multocida* has been the main causative agent identified.¹⁷⁻¹⁹

The diagnosis of *P. multocida* has been traditionally based on clinical signs and physicochemical characteristics of the agent. Tests are performed based on phenotypic characteristics; however, culture conditions may affect the expression of the bacterium properties and decrease specificity and sensitivity of methods based on these characteristics.

For biochemical identification of *P. multocida* there are methods based on miniaturized commercial systems that make typing easier and faster, among them is API 20NE, which is used as a tool for identification of Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from

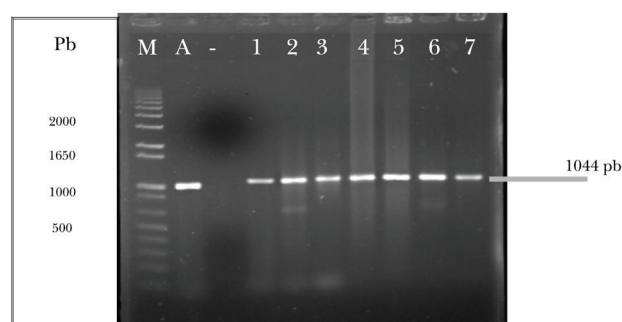


FIGURA 2. Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado faríngeo de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Control positivo A, (-) Control negativo, carriles 1-7 cepas de campo

FIGURE 2. Amplification product by multiplex PCR from bovine pharyngeal exudate samples. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel. (M) Marker, (A) Positive control A, (-) Negative control, lanes 1 – 7: field strains.

Tipificación molecular

Mediante la prueba de PCR se amplificaron los genes *hyaD-hyaC* para el grupo capsular A, y el gen *dcfF* para el grupo D, cuyos productos de amplificación tuvieron un peso molecular esperado de 1044 pb para el grupo A y de 657pb para el grupo D (**FIGURA 1**). Por medio de la PCR múltiple se logró la amplificación de un producto de ~1044 pb en 100% de las cepas (n = 32), que corresponde al grupo capsular A de *P. multocida* (**FIGURA 2**)

Frecuencia de *P. multocida* en bovinos clínicamente sanos destinados a la producción de carne.

Con base en los resultados obtenidos en la identificación bioquímica y molecular, la frecuencia estimada de *P. multocida* fue de 14.09 % (32/227), de la cual el 100% (32/32) fue grupo A.

Discusión

El CRB ha sido reconocido como una enfermedad de gran importancia económica en el ganado. Su confirmación es difícil debido a la variedad en los signos clínicos y a que los procedimientos para su diagnóstico pueden tomar mucho tiempo. Los agentes bacterianos son los patógenos más comúnmente involucrados, actualmente no existe una prueba eficaz y sencilla para determinar la etiología de la enfermedad.^{1, 11,12}

Las principales bacterias encontradas en los problemas respiratorios en el ganado bovino son:

veterinary medical sources, with very satisfying results in *P. multocida* and *M. haemolytica* strains.¹⁹ The API system is able uniquely to identify *P. multocida* in 64% less time compared to other systems such as Oxi/Ferm. The percentage of identification errors is only 10% in *P. multocida* isolates.^{19,22}

In the results obtained by this system, a high percentage of identification and complete typicality to *P. multocida* was observed in 100% of the isolates. With the use of API 20NE system, it was possible to identify 32 strains (14.09%), such as *P. multocida*, which showed 96% of identification and typicality of 1; twelve strains (5.28%) with 96% of identification and typicality smaller than 1 were observed. The results of the biochemical profile of the strains studied in this work, with regard to the percentage of identification and typicality regarding *P. multocida*, coincide with the results obtained by Campuzano *et al.*,⁸ who in 97.5% of the strains analyzed found 96% of identification and typicality of 1, for which, API 20NE identification system is considered an easy method with high reliability for the identification of this microorganism.

It has been observed that detection of *P. multocida* is performed faster using PCR technique. With the identification of genes involved in the biosynthesis of capsular polysaccharides, the specific sequences of the capsular groups are identified as primers for capsular typing of *P. multocida*.²² The use of colony PCR technique or DNA boiling extraction method reduces the time it takes for typing without having to perform bacterial DNA extraction by more expensive and slower methods, as the case of alkaline lysis. PCR targeting the *hyaC-hyaD* gene provides specific detection of *P. multocida* strains.^{11,12}

The advantages of PCR compared with other tests include rapidness, sensitivity, specificity and simplicity. It does not need special culture mediums or inoculation of laboratory animals; therefore, it is safer because there is no need to handle live bacteria.¹¹

The frequencies of the present study (14.09%), of which 100% were identified as capsular group A, are similar to other authors that have identified group A in percentages that range from 80% to 100%.²² Similar studies have been conducted in sheep, calves and dairy cattle, in which capsular group A is the most frequently found with percentages that range from 77 to 97.3%;^{5,13} while in capsular group D, the interval ranges from 0.02 to 27%.^{21,23,24} Yates²⁵ mentions that type A is commonly associated with bovine pneumonia, while group D is sporadically found in cases of respiratory disease.

In other reports based on phenotypic characterization of *P. multocida* strains of bovine and some other ruminant origin, the predominant capsular group is A. Research carried out on pneumonic lung tissue samples

M. haemolytica, *H. somni* y *P. multocida*, ésta última se cita como la más comúnmente aislada en las neumonías de becerras de razas especializadas en la producción de leche,^{13,14} lo cual refleja, en alguna medida, la naturaleza oportunista de este microorganismo al superar el desarrollo de otras bacterias.^{15,16}

Se han identificado los grupos capsulares A y D de *P. multocida* como los responsables de la pasteurelosis neumónica en México. En estudios llevados a cabo en el país con muestras pulmonares provenientes de rastros, se han logrado aislamientos de *Pasteurella* spp en alrededor de 50% de los casos, en los que *P. multocida* ha sido el principal agente patógeno identificado.¹⁷⁻¹⁹

El diagnóstico de *P. multocida* se ha basado en la presencia de signos clínicos y la presentación de características fisicoquímicas del agente. Las pruebas se realizan con base en características fenotípicas; sin embargo, las condiciones de cultivo pueden influir en la expresión de las propiedades de la bacteria y con ello disminuir la especificidad y sensibilidad de los métodos basados en estas características.

Para la identificación bioquímica de *P. multocida* se dispone de métodos que se basan en microsistemas comerciales o miniaturizados, los cuales facilitan y agilizan la tipificación. Entre ellos se encuentra el sistema API 20NE, el cual se ha empleado como herramienta en la identificación de enterobacterias y no enterobacterias en medicina veterinaria, con resultados muy satisfactorios en cepas de *P. multocida* y *M. haemolytica*.¹⁹ El sistema API es capaz de identificar con precisión *P. multocida* en menos tiempo (64% menos), en comparación con otros sistemas como Oxi/Ferm. El porcentaje de errores de identificación es de sólo 10% en los aislamientos de *P. multocida*.²⁰⁻²¹

En los resultados obtenidos mediante el uso de este sistema se observó un alto porcentaje de identificación y tipicidad completa a *P. multocida* en 100% de los aislamientos. Al utilizar el sistema API 20NE se logró identificar 32 cepas (14.09%) como *P. multocida*, las cuales mostraron 96% de identificación y tipicidad de 1 a *P. multocida*; se observaron 12 cepas (5.28%) con porcentajes de identificación y tipicidad menores a 96% y 1, respectivamente. Los resultados obtenidos del perfil bioquímico de las cepas estudiadas en este trabajo, en cuanto al porcentaje de identificación y tipicidad con respecto a *P. multocida*, concuerdan con los obtenidos por Campuzano *et al.*,⁸ quienes en 97.5% de las cepas analizadas encontraron 96% de identificación y tipicidad de 1 a *P. multocida*, por lo cual se considera al sistema de identificación API 20NE como un método fácil de aplicar y de alta confiabilidad para el reconocimiento de este microorganismo.

Se ha observado que la detección de *P. multocida* se realiza en una menor cantidad de tiempo utilizando la técnica de PCR. Con la identificación de los genes

of Holstein calves in the Estado de México²⁴ and on pneumonic lung tissue in the Estado de México and Durango, reported the presence of group A in an interval that ranges from 98.7 to 100% of the samples studied and 1.2% for group D.^{19,24} Blanco *et al.*¹⁸ reported the presence of group A in 100% of *P. multocida* isolates from pneumonic lungs of calves in the Estado de México.

In the present study, the totality of *P. multocida* isolates correspond to capsular group A, these results show that this group predominates in clinically healthy beef cattle and they are similar to the results obtained by Campuzano *et al.*,⁸ where nasal exudate samples from clinically healthy dairy cattle from the Región Lagunera in the states of Coahuila and Durango and in the state of Hidalgo, were used, which corroborates that, similarly to other countries of Europe and America, in Mexico, the predominant capsular group of *P. multocida* is A.

Identification and characterization of capsular groups of *P. multocida* is important for prevention and treatment of pneumonic pasteurellosis in beef cattle. Also, it enables to increase knowledge of the epidemiological situation of this microorganism in the municipality of Ezequiel Montes, state of Querétaro. Similarly, it may contribute to the development of more efficient immunogens and as support in prevention and control programmes of this disease.

It is important to point out that there are no similar data in Mexico on identification and characterization of *P. multocida* in beef cattle.

Acknowledgements

Special thanks to Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología for the support received for Project CB104031, to Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública and to Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the UNAM, for the facilities granted for carrying out this study.

Referencias

1. COOPER VL, BRODERSEN BW. Bovine Respiratory Disease. Vet Clin North Am: Food Anim Pract 2010; 26:191-426.
2. LILIE LE. The Bovine Respiratory Disease Complex. The Canadian Veterinary Journal. Symposium on Immunization of Cattle Against the Common Diseases of the Respiratory Tract. Rev Vet Can 1974; 15:233-42.
3. JARAMILLO ACJ, TRIGO TFJ, SUÁREZ GF, Mannheimiosis Bovina: Etiología, Prevención y Control. Vet Méx 2009; 403:293-311.

implicados en la biosíntesis del polisacárido capsular, las secuencias específicas de los grupos capsulares identificadas se utilizan como iniciadores para la tipificación capsular de *P. multocida*.²² La PCR puede realizarse a partir de una colonia bacteriana o mediante la extracción de ADN por ebullición, lo que reduce el tiempo para la tipificación, sin necesidad de la extracción del ADN bacteriano por métodos más costosos o con mayor inversión de tiempo, como en el caso de la lisis alcalina. La PCR dirigida a los genes *hyaD* -*hyaC* proporciona una detección específica de las cepas de *P. multocida*.^{11,12}

Las ventajas de la PCR, en comparación con otras pruebas existentes, incluyen una mayor velocidad, sensibilidad, especificidad y simplicidad. No requiere medios de cultivo especiales ni la inoculación de animales de laboratorio y, por lo tanto, es más segura, ya que evita el manejo de bacterias vivas.¹¹

Las frecuencias del presente trabajo (14.09%), de las cuales el 100% fue identificada como grupo capsular A, son similares a las registradas por otros autores que han reconocido al grupo A en porcentajes que van de 80% hasta 100%.²² Trabajos similares se han realizado en ovinos, becerras y ganado lechero, en los que el grupo capsular más frecuentemente encontrado es el A, con porcentajes que van desde 77 hasta 97.3%,^{5,13} mientras que en el grupo capsular D el intervalo es de 0.02 hasta 27%.^{21,23,24} Yates²⁵ menciona que el tipo A está asociado comúnmente con la neumonía en bovinos, mientras que el grupo D sólo se encuentra esporádicamente en casos de enfermedad respiratoria.

En otros informes basados en la caracterización fenotípica de las cepas de *P. multocida* de origen bovino y otros rumiantes, el grupo capsular predominante es el A. Investigaciones realizadas en bovinos con muestras de pulmones neumónicos de becerras Holstein en el Estado de México,²⁴ y en pulmones neumónicos en el Estado de México y en Durango, informaron la presencia del grupo A en un intervalo de 98.7 a 100% de las muestras estudiadas y 1.2 % para el grupo D.^{19,24} Blanco *et al.*¹⁸ indicaron la presencia del grupo A en el 100% de los aislamientos de *P. multocida* en pulmones con lesiones neumónicas provenientes de becerras en el Estado de México.

En el presente estudio, la totalidad de los aislamientos de *P. multocida* corresponden al grupo capsular A, dichos resultados demuestran que este grupo predomina en los bovinos clínicamente sanos destinados a la producción cárnica y se asemejan a los resultados obtenidos en el trabajo de Campuzano *et al.*,⁸ en el que se utilizaron muestras de exudado nasal de bovinos lecheros clínicamente sanos procedentes de la Comarca Lagunera de los estados de Coahuila y Durango, y en el estado de Hidalgo, con lo cual se corro-

4. BOYCE RY, WILKIE I, ADLER B. *Pasteurella and Mannheimia* In: GYLES CL, PRESCOTT JF. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd ed. Iowa: Blackwell Publishing 2007; 1: 273-270.
5. VIDHYA M, CHANDRAN DJ, MANOBAR P, DHINAKAR R. Molecular identification of serogroups of *Pasteurella multocida* isolated from sheep by capsular PCR typing. J Vet Anim Sci 2007;3:140-143.
6. CUETO LM, PASCUAL HA. *Pasteurella multocida*. Departamento de microbiología. Hospital universitario Virgen Macarena. Sevilla. [En línea: 2013 enero] [Citado: 2013 enero 20]. Disponible en: <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/pmultocida.pdf>
7. BOYCE JD, JING YC, ADLER B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. J Biotechnol 2000; 83:153-160.
8. CAMPUZANO VM, GONZÁLEZ RAD, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF, TRIGO TFJ, JARAMILLO ACJ. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Pasteurella multocida* de exudado nasal en bovinos, en dos cuencas lecheras de México. Vet Méx 2011; 1:1-10.
9. BOYCE JD, CHENG JY, ADLER B. Genetic organization of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M104 (B:2). Vet Microbiol 2000; 72:121-34.
10. JARAMILLO ACJ, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF, MARTÍNEZ MJ, AGUILAR RF, JARAMILLO ML *et al*. Characterization of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudate and factors associated with isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. Res Vet Sci 2008; 84: 7-13.
11. SZABO I, UDA H, SAKAMOTO H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. Clin Pathol 1994; 47:318-323.
12. RAJEEV G, KUMAR A, SINGH VP, VIJENDRA P, SINGH, T.K. DUTTA, SB. Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. Division of Bacteriology and Mycology, Indian Veterinary Research Institute, Veterinary science 2004; 76:179-185.
13. DE ROSA DC, MECHOR GD, STAATS JJ, CHENGAPPA MM. Comparison of *Pasteurella* spp simultaneously Isolated from Nasal and Transtracheal Swabs from Cattle with Clinical Signs of Bovine Respiratory Disease. Elanco Animal Health, Greenfield, Indiana 46140, 1 and Kansas State University. J Clin Microbiol 2000; 38:327-332.
14. GOURLAY RN, THOMAS LH, WYLD SG. Experimental *Pasteurella multocida* pneumonia in calves. Res Vet Sci 1989; 47:185-189.
15. VIRTALA AMK, MECHOR GD, GROHN YT, ERB HN, DUBOVI EJ. Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. J Am Vet Med Assoc 1996; 208:2035-2042.
16. AMES TR. Dairy calf pneumonia. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1997; 13:379-391.
17. TRIGO TF, HERNÁNDEZ LG, RAMÍREZ CC, BERRUECOS VM. Patología y bacteriología de

bora que, de manera similar a otros países de Europa y América, en México el grupo capsular predominante de *P. multocida* es el A.

La identificación y caracterización de los grupos capsulares de *P. multocida* es importante en la prevención y tratamiento de la pasteurelisis neumónica en bovinos destinados a la producción de carne, así como para conocer la situación epidemiológica de este microorganismo en el municipio de Ezequiel Montes, en el estado de Querétaro. De igual forma, puede contribuir al desarrollo de inmunógenos más eficaces y como apoyo en los programas de prevención y control de dicha enfermedad.

Es menester resaltar que no existen datos publicados en México sobre la identificación y caracterización de *P. multocida* en bovinos destinados a la producción de carne.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo recibido para el proyecto CB104031; al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

-
- pulmones neumónicos de becerros. Vet Méx 1982; 13:131-140.
 18. BLANCO-VIERA FJ, TRIGO FJ, JARAMILLO ML, AGUILAR RF. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. Rev Lat-Amer Microbiol 1995; 37:121-126.
 19. JARAMILLO ACJ, HERNANDEZ CR, CAMPUZANO OV, SUÁREZ GR, DELGADO GR, TRIGO TF. Characterization of *Mannheimia* sp and *P. multocida* strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico. J Anim Vet Adv 2007; 12:1384-1403.
 20. DABO SM, DEBEY BM, MONTELONGO M, CONFER W. Genomic DNA restriction site heterogeneity in bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates detected with rRNA probe. J. Med Microbiol 1999; 48: 279-286.
 21. COLLINS MT, WEAVER N, ELLIS RP. Identification of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* by API 20NE, Minitek and Oxy/ferm Systems. J Clin Microb 1981; 13:433-437.
 22. TOWNSEND KM, BOYCE JD, YENG CJ, 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.

23. DE LA ROSA RJL, JARAMILLO ACJ, MARTÍNEZ MJJ, AGILAR RF, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF *et al.* Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en becerras con signos clínicos de enfermedad respiratoria, en un complejo lechero del estado de Hidalgo, México. Vet Méx 12; 43:1-10.
24. JARAMILLO CL, AGUILAR RF, TRIGO TF. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. Vet Méx 1987; 18:185-188.
25. YATES WDG. A review of infectious bovine rhynotracheitis, shipping fever pneumonia and viralbacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can J Comp Med 1982; 46:225-263.