



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Identificación histopatológica y molecular de los  
principales agentes bacterianos asociados a  
neumonías en bovinos.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
PRESENTA:**

**Jazmín Solís Hernández**

**Tutora Principal:**

**Dra. Luary C. Martínez Chavarría (FMVZ, UNAM)**

**Comité tutorial:**

**Rigoberto Hernández Castro (Hospital General Dr. Manuel Gea González)**

**Gerardo Salas Garrido (FMVZ, UNAM)**

**Ciudad Universitaria, CD. MX., marzo 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria**

A mis seres queridos.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme el espacio para mi formación en el posgrado.

Al departamento de Patología y su personal, que me apoyó en todo momento en el procesamiento de las muestras, así como en la edición del material fotográfico.

A la Dra. Luary Carolina Martínez Chavarría por haberme aceptado en el proyecto y en el laboratorio. Por facilitarme los instrumentos para el desarrollo del proyecto, por sus enseñanzas, guía, orientación y acompañamiento a lo largo de toda la maestría.

Al equipo del laboratorio de patología molecular por su paciencia y por las constantes reuniones de estudio: Dra. Luary, Jesús, Tatiana y Hugo.

Al Centro de Enseñanza y Diagnóstico de Enfermedades de Bovinos de la UNAM y al encargado, el M en C. Mario Adán Bedolla por proporcionarnos los casos para la investigación y el seguimiento al proyecto.

Al CONACYT por el apoyo económico que me proporcionó durante la maestría.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por sus enseñanzas y por la donación de las cepas de referencia para la estandarización de las PCRs.

Al M en C. Gerardo Salas Garrido por las constantes asesorías y por facilitarme material bibliográfico.

A mis amigos del departamento de patología por la orientación y la facilidad de material bibliográfico: Tatiana, Saulo, Hugo, Erik y Alberto.

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 3  |
| 1.1. Características anatómicas e histológicas del pulmón bovino .....                      | 4  |
| 1.2. Mecanismos de defensa pulmonar .....   | 9  |
| 1.3. Clasificación de neumonías en bovinos .....  | 11 |
| 1.4. Principales bacterias involucradas en las neumonías en bovinos .....                   | 12 |
| 1.4.1. <i>Mannheimia haemolytica</i> .....  | 13 |
| 1.4.2. <i>Pasteurella multocida</i> .....   | 16 |
| 1.4.3. <i>Histophilus somni</i> .....   | 18 |
| 1.4.4. <i>Trueperella pyogenes</i> .....  | 20 |
| 1.4.5. <i>Mycoplasma bovis</i> .....  | 21 |
| 2. ANTECEDENTES .....   | 23 |
| 3. JUSTIFICACIÓN .....  | 26 |
| 4. HIPÓTESIS .....  | 26 |
| 5. OBJETIVOS .....  | 26 |
| 5.1. Objetivo general .....   | 27 |
| 5.2. Objetivos específicos .....  | 27 |
| 6. METODOLOGÍA .....  | 27 |
| 6.1. Animales de estudio .....  | 27 |
| 6.2. Estudio <i>post mortem</i> .....   | 28 |
| 6.3. Estudio histopatológico .....  | 29 |
| 6.4. Extracción de ADN .....  | 30 |
| 6.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....  | 31 |
| 7. RESULTADOS .....   | 33 |
| 7.1. Descripción de las lesiones macroscópicas (diagnóstico morfológico macroscópico) ..... | 33 |
| 7.1.1. Bronconeumonía supurativa .....  | 33 |
| 7.1.2. Bronconeumonía fibrinosa .....   | 35 |
| 7.1.3. Neumonía intersticial .....  | 37 |
| 7.1.4. Neumonía granulomatosa .....   | 38 |
| 7.2. Descripción de las lesiones microscópicas (diagnóstico morfológico microscópico) ..... | 40 |
| 7.2.1. Bronconeumonía supurativa .....  | 41 |
| 7.2.2. Bronconeumonía fibrinosa .....   | 43 |
| 7.2.3. Neumonía intersticial .....  | 45 |

|  |    |
|--|----|
| 7.2.4. Neumonía granulomatosa .....  | 46 |
| 7.3. Extracción de ADN.....  | 53 |
| 7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....   | 53 |
| 7.5. Relación entre los diagnósticos morfológicos y la identificación de los géneros bacterianos ..... | 58 |
| 8. DISCUSIÓN .....   | 61 |
| 9. CONCLUSIONES .....  | 69 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 70 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Esquema del pulmón bovino, vista dorsal y ventral.....                                  | 5  |
| Figura 2. Mecanismos de defensa pulmonar.....   | 9  |
| Figura 3. Homeostasis pulmonar vs inflamación causada por bacterias.....                          | 10 |
| Figura 4. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y la leucotoxina (LKT) de <i>M. haemolytica</i> . ... | 15 |
| Figura 5. Membrana externa y proteínas asociadas de <i>P. multocida</i> . .....                   | 17 |
| Figura 6. Efecto de los factores de virulencia de <i>H. somni</i> . .....                         | 19 |
| Figura 7. Posible patogenia de las infecciones por <i>T. pyogenes</i> . .....                     | 21 |
| Figura 8. Daño pulmonar causado por <i>M. bovis</i> . .....                                       | 23 |
| Figura 9. Estados de la República Mexicana donde se han reportado neumonías en bovinos .....      | 25 |
| Figura 10. Tipos de neumonías según características macroscópicas.....                            | 29 |
| Figura 11. Diagnósticos morfológicos macroscópicos de los pulmones evaluados .....                | 33 |
| Figura 12. Lesiones asociadas con bronconeumonía supurativa. ....                                 | 34 |
| Figura 13. Lesiones asociadas con bronconeumonía supurativa. ....                                 | 35 |
| Figura 14. Lesiones asociadas con bronconeumonía fibrinosa. ....                                  | 36 |
| Figura 15. Lesiones asociadas con neumonía intersticial. ....                                     | 37 |
| Figura 16. Lesiones asociadas con neumonía granulomatosa.....                                     | 38 |
| Figura 17. Hallazgos microscópicos observados en la bronconeumonía supurativa. ....               | 41 |
| Figura 18. Hallazgos microscópicos observados en la bronconeumonía supurativa. ....               | 42 |
| Figura 19. Hallazgos microscópicos observados en la bronconeumonía fibrinosa. ....                | 43 |
| Figura 20. Hallazgos microscópicos observados en la bronconeumonía fibrinosa. ....                | 44 |
| Figura 21. Hallazgos microscópicos observados en la neumonía intersticial. ....                   | 45 |
| Figura 22. Hallazgos microscópicos observados en la neumonía intersticial. ....                   | 46 |
| Figura 23. Hallazgos microscópicos observados en la neumonía granulomatosa. ....                  | 47 |
| Figura 24. Hallazgos microscópicos observados en la neumonía granulomatosa. ....                  | 48 |
| Figura 25. Procesos inflamatorios involucrados en los casos de neumonías evaluados. ....          | 48 |
| Figura 26. Gradificación de lesiones por región anatómica en cada caso. ....                      | 49 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 27. Electroforesis de los productos de amplificación empleados como controles positivos. ....                          | 54 |
| Figura 28. Electroforesis de los productos de amplificación a partir de las muestras de pulmones de bovinos. ....             | 55 |
| Figura 29. Número de casos en los que se detectaron los diferentes géneros bacterianos. .                                     | 57 |
| Figura 30. Bacterias encontradas en cada caso. ....   | 58 |
| Figura 31. Gráfica de las diferentes bacterias en relación con el tipo de neumonía. ....                                      | 58 |
| Figura 32. Gráfica de la cantidad de bacterias encontradas en cada caso y la puntuación de daño del parénquima pulmonar. .... | 60 |
| Figura 33. Comparación de bacterias detectadas en diferentes estudios sobre neumonías en bovinos. ....                        | 67 |

### Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Características histológicas del pulmón y sus componentes. ....  | 6  |
| Tabla 2. Características histológicas del aparato respiratorio inferior. ....                                     | 8  |
| Tabla 3. Clasificación de neumonías según Caswell y Williams (2016). ....   | 11 |
| Tabla 4. Clasificación de neumonías según López y Martinson (2017). ....  | 12 |
| Tabla 5. Registro de bovinos. ....  | 28 |
| Tabla 6. Clasificación de neumonías. ....   | 29 |
| Tabla 7. Clasificación de neumonías de acuerdo con sus características microscópicas. ....                        | 30 |
| Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en este trabajo. ....   | 31 |
| Tabla 9. Diagnósticos morfológicos macroscópicos. ....  | 39 |
| Tabla 10. Gradificación de las lesiones pulmonares. ....  | 50 |
| Tabla 11. Diagnósticos morfológicos microscópicos de los casos. ....  | 51 |
| Tabla 12. Cuantificación de ADN extraído a partir de las muestras de pulmón de bovino embebidas en parafina. .... | 53 |
| Tabla 13. Resultados de las PCRs realizadas con las muestras de los pulmones de bovinos. ....                     | 56 |

## Lista de abreviaturas

°C: grados Celsius

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**BHV-1:** Herpesvirus bovino tipo 1

**BRSV:** virus sincitial respiratorio bovino

**CbpA:** proteína de unión a colágeno

**CDC:** citolisinas dependientes del colesterol

**D:** dominio

**Er:** epitelio respiratorio

**Fim:** fimbrias

**h:** horas

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**IbpA:** proteína de unión a inmunoglobulina A

**IL:** interleucina

**IL-1β:** interleucina 1 beta

**LKT:** leucotoxina

**LOS:** lipooligosacárido

**Lp:** lámina propia

**LPP:** lipoproteína

**LPS:** lipopolisacárido

**MB:** membrana basal

**μl:** microlitros

**μm:** micrómetros

**μM:** micromolar

**min:** minutos

**ml:** mililitros

**Mnu:** nucleasas

**MPM:** marcador de peso molecular

**n:** número

**Nan:** neuraminidasas

**NK:** “*Natural killers*” (células asesinas naturales)

**NOS:** especies reactivas de nitrógeno

**NOX:** NADH oxidasa

**O<sub>2</sub>:** oxígeno

**Omp:** proteínas de membrana externa

**PAMPS:** patrones moleculares asociados a patógenos

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés



**RT-PCR:** PCR transcriptasa reversa o PCR en tiempo real, por sus siglas en inglés

**PI-3:** parainfluenza-3

**PLO:** piolisina

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**Rpm:** revoluciones por minuto

**RTX:** toxinas repetidas

**s:** segundos

**SIAP:** servicio de información agroalimentaria y pesquera

**TLR:** receptores tipo Toll

**TNF $\alpha$ :** interferón alfa

**TrmFO:** metilnotetrahidrofolato-tRNA-(uracil-5-)-metiltransferasa

**$\mu$ l:** microlitros

**$\mu$ M:** micromolar

**Vsps:** lipoproteína de superficie variable

## Resumen

Los procesos neumónicos son las condiciones respiratorias más frecuentes en bovinos. Los agentes bacterianos son patógenos que complican la neumonía y una vez que colonizan el parénquima pulmonar suelen causar la muerte. El presente estudio tuvo como objetivo identificar a los principales agentes bacterianos asociados a neumonía en bovinos, tales como *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Histophilus somni* (*H. somni*), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) y *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), mediante PCR convencional en 38 muestras de pulmón bovino. Así mismo, describir y clasificar las diferentes lesiones macro y microscópicas provocadas por estos agentes en los pulmones de bovinos. La bronconeumonía fue el tipo de neumonía más frecuente en este estudio, distinguiéndose por la consolidación de la zona craneoventral del pulmón con presencia de exudado fibrinoso o supurativo. Microscópicamente, las lesiones fueron muy variadas y reportamos patrones de daño mixtos; sin embargo, predominó el infiltrado inflamatorio de piocitos y macrófagos espumosos, ocupando tanto espacios alveolares como bronquios y bronquiolos. Las lesiones más comunes fueron bronquiolitis, bronquitis, ciliostasis, edema, congestión y necrosis. La especie bacteriana más frecuentemente identificada fue *H. somni*, encontrada en 31 casos, seguida de *P. multocida* en 27 casos, *M. bovis* en 22 casos, *M. haemolytica* en 19 casos, *M. ruminalis* en 18 casos y *T. pyogenes* en 11 casos. 32 de 38 casos presentaron más de dos especies bacterianas involucradas en el proceso neumónico. Uno de los hallazgos más relevantes del estudio fue la detección de *M. ruminalis* en 18 casos. Este es el primer informe en el que este microorganismo se asocia a procesos neumónicos en bovinos; para comprender mejor su participación en estos, se deben realizar más estudios. Nuestros resultados resaltan la importancia de considerar otros patógenos involucrados y conocer su participación durante el desarrollo de neumonía en bovinos.

## Abstract

Pneumonic processes are the most common respiratory conditions in cattle. Bacterial agents are pathogens that complicate pneumonia and once they colonize the lung parenchyma, they usually cause death. The present study aimed to identify the main bacterial agents associated with pneumonia in cattle, such as *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Histophilus somni* (*H. somni*), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) and *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), by conventional PCR in 38 bovine lung samples. In addition, we also described and classified the different macro and microscopic lesions caused by these agents in bovine lungs. Bronchopneumonia was the most common type of pneumonia in this study, distinguished by the consolidation of the cranioventral zone of the lung with the presence of fibrinous or suppurative exudate. Microscopically, the lesions were very varied, and we reported mixed damage patterns; however, the inflammatory infiltrate of piocytes and foamy macrophages was predominant, occupying alveolar spaces as well as bronchi and bronchioles. The most common lesions were bronchiolitis, bronchitis, ciliostasis,

edema, congestion, and necrosis. The most frequently identified bacterial species was *H. somni*, found in 31 cases, followed by *P. multocida* in 27 cases, *M. bovis* in 22 cases, *M. haemolytica* in 19 cases, *M. ruminalis* in 18 cases, and *T. pyogenes* in 11 cases. 32 out of 38 cases presented more than two involved bacterial species. One of the most relevant findings of the study was the detection of *M. ruminalis* in 18 cases. This is the first report where it is associated with pneumonic processes in cattle. In order to better understand its participation in pneumonic processes, more studies should be carried out. Our results highlight the importance of considering other pathogens involved and knowing their participation during the development of pneumonia in cattle.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las afecciones pulmonares son el resultado de la alteración de las estructuras anatómicas que conforman el parénquima pulmonar (bronquios, bronquiolos y alvéolos) o de trastornos fisiológicos de estas estructuras (Orellana, 2015).

La palabra "neumonía" tiene su origen en la palabra del griego antiguo "pneumon", que significa "pulmón" y el sufijo "ia" que significa condición. En términos médicos se refiere a la inflamación del parénquima pulmonar que es frecuentemente, pero no siempre, causada por infecciones. Los agentes etiológicos comúnmente involucrados son las bacterias, virus, hongos y parásitos (Sattar y Sharma, 2021; Jain *et al.*, 2022). Existen disyuntivas para esa definición; diversos autores definen la neumonía como un proceso inflamatorio localizado principalmente en los alvéolos (Trigo *et al.*, 2017). Por tanto, actualmente no existe uniformidad para el uso de este término. Con la finalidad de buscar un significado integral, el término pasó de ser utilizado como una valoración temporal a algo más completo e inclusivo que se aproxime a la presentación clínica del individuo. En general, es un término genérico asignado a procesos inflamatorios causados por alteraciones del parénquima pulmonar (Orellana, 2015; Jain *et al.*, 2022).

En medicina veterinaria, particularmente en el área de bovinos, los términos "enfermedad respiratoria bovina", "síndrome respiratorio bovino", "complejo respiratorio bovino" y "enfermedad pulmonar polimicrobiana" se utilizan como sinónimo integral del término "neumonía". Esto debido a los distintos agentes etiológicos que podrían estar involucrados, los procesos inflamatorios que desencadenan y las diversas manifestaciones clínicas de los animales que la padecen (Ackermann *et al.*, 2010; Panciera y Confer, 2010; Stokka, 2010; Gorden y Plummer, 2010; Horwood *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2021).

Los pulmones no son un órgano estéril; tienen exposición a patógenos debido a la conexión del medio externo a través del aparato respiratorio superior y digestivo, así como del medio interno por circulación sanguínea (Choudhary *et al.*, 2019). Además, los bovinos tienen diferencias anatómicas que los hacen más susceptibles a los patógenos con respecto a otras especies (Ackermann *et al.*, 2010). Asimismo, la naturaleza de la producción bovina los predispone al desarrollo de enfermedades respiratorias las cuales se desencadenan debido a la sinergia entre patógenos, estado inmunológico del animal, condiciones ambientales, transporte, hacinamiento, y edad, entre otros (Hay *et al.*, 2017).

Para comprender mejor el desarrollo de los procesos neumónicos, es necesario conocer la función, estructura anatómica e histológica de los pulmones en condiciones de homeostasis.

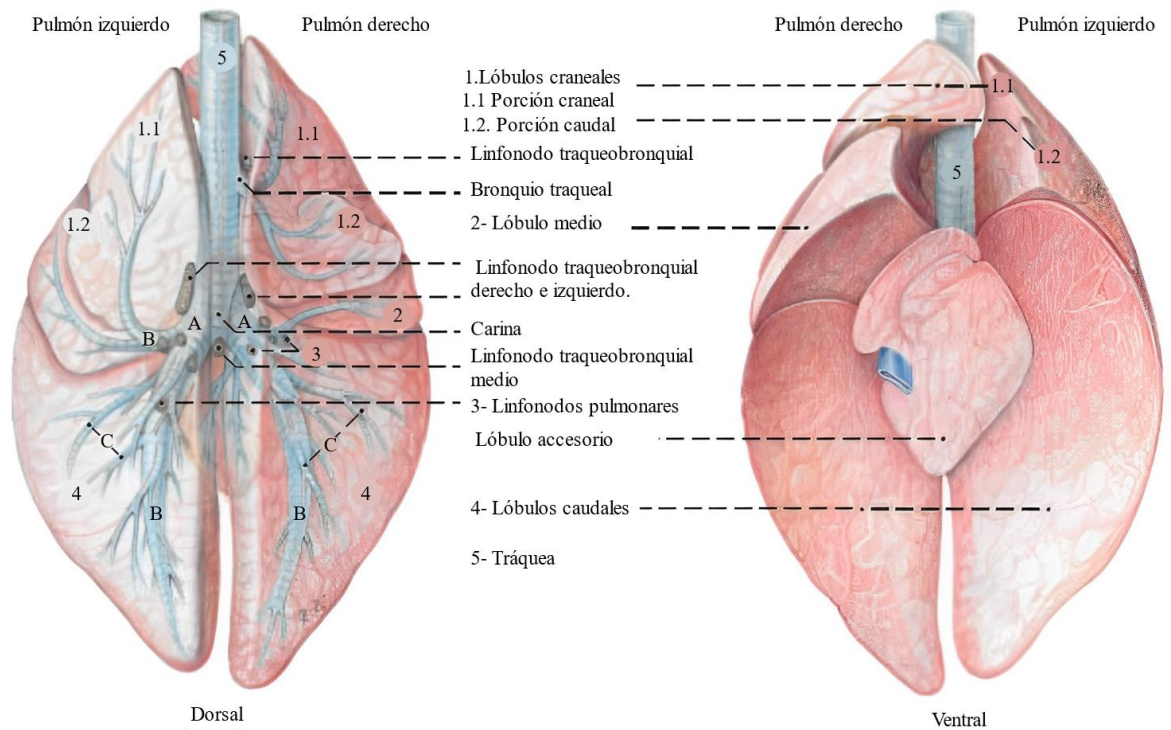
## 1.1. Características anatómicas e histológicas del pulmón bovino

El sistema respiratorio tiene como función principal permitir el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre. Este sistema se divide en sistema de conducción y sistema de intercambio gaseoso. El sistema de intercambio gaseoso o tracto respiratorio inferior está compuesto por bronquiolos respiratorios, ductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos. Los bronquiolos funcionan como la sección de traslación entre el sistema de conducción y el sitio de intercambio gaseoso, esto debido a que la desaparición de los cilios en el sistema de transición no es abrupta; las células ciliadas en la región bronquiolar proximal se vuelven escasas y progresivamente atenuadas, hasta el punto en que los bronquiolos distales ya no tienen células ciliadas (König *et al.*, 2004; López y Martinson, 2017).

El pulmón es un órgano situado en la cavidad torácica, está compuesto por el parénquima y por el intersticio (estroma). El parénquima es la parte donde ocurre el intercambio gaseoso, esto comprende los bronquiolos y sus ramificaciones, así como los alvéolos pulmonares terminales. El pulmón se encuentra recubierto por la pleura, membrana serosa compuesta por tejido conjuntivo, tejido elástico y fibras musculares lisas. La pleura mantiene la tensión necesaria para que pueda realizarse la expansión y contracción rítmica de los pulmones además de reducir la fricción durante la respiración. Debajo de la pleura, una cápsula fibrosa encierra el órgano y forma tabiques entre los lobulillos. La elasticidad del tejido intersticial es la responsable de la capacidad expansiva del pulmón durante la inspiración y del colapso parcial durante la espiración (Budras *et al.*, 2004).

En los bovinos, el pulmón izquierdo consta del lóbulo craneal que se divide en porción craneal y porción caudal y del lóbulo caudal. El pulmón derecho consta de cuatro lóbulos, el lóbulo craneal (con su porción craneal y caudal), lóbulo intermedio y lóbulo caudal, y en el receso mediastínico se encuentra el lóbulo accesorio (Figura 1). Cada lóbulo pulmonar se subdivide a su vez en lobulillos pulmonares por medio de tejido conjuntivo, que en bovinos es bastante prominente (König *et al.*, 2004).

El bronquio se divide dentro del pulmón dicotómicamente o tricotómicamente de manera irregular, cada nueva generación es más pequeña en diámetro, de este modo se forma el árbol bronquial. El árbol bronquial se divide en vías respiratorias y en sitio de intercambio gaseoso. La primera división incluye bronquio principal, bronquio lobular, bronquio segmental, bronquio subsegmental, bronquiolo verdadero y bronquiolos terminales y la segunda división consta de bronquiolo respiratorio, ductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos pulmonares (König *et al.*, 2004; Murillo López de Silanes, 2018). El pulmón bovino presenta un alto grado de lobulación y un alto porcentaje de tejido intersticial, esto conduce a una distensibilidad pulmonar relativamente baja y a una mayor resistencia del tejido, de modo que la actividad respiratoria requerida es más alta en comparación con otras especies (Prohl *et al.*, 2014).

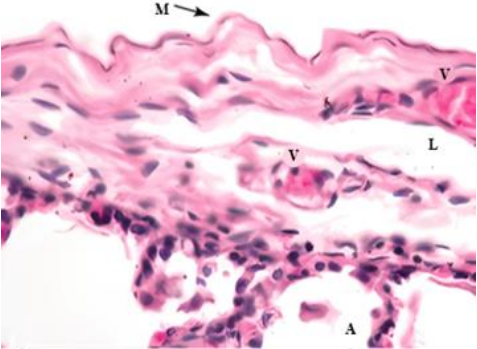
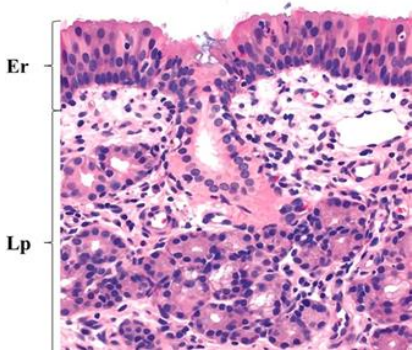
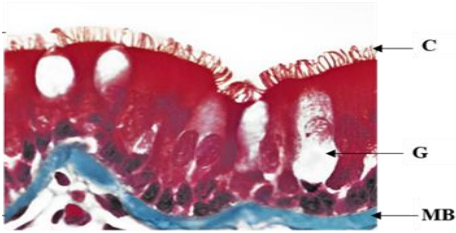


**Figura 1. Esquema del pulmón bovino, vista dorsal y ventral.**

**A:** Bronquio principal. **B:** Bronquio lobular. **C:** Bronquio segmental. Tomado y modificado de Budras *et al.*, 2004.

El epitelio que recubre cada componente del pulmón tiene características estructurales que le confieren al hospedero protección mecánica; además algunos componentes celulares de este epitelio son capaces de producir péptidos antimicrobianos o defensas, lo que le confiere defensas moleculares. Tanto la estructura como sus secreciones sirven para proteger al pulmón de agentes nocivos. A continuación se detallan las características histológicas de los componentes del pulmón (Tabla 1) y se desglosan sus principales funciones (Tabla 2).

**Tabla 1. Características histológicas del pulmón y sus componentes.**

| Sección                                       | Descripción microscópica  |  |
|---|---|--|
| <b>Pleura</b>                                 | <p><b>M:</b> Mesotelio escamoso simple dispuesto sobre una capa delgada de tejido conectivo que recubre los alvéolos (<b>A</b>). El tejido conjuntivo es rico tanto en colágeno como en fibras elásticas y contiene tanto vasos sanguíneos (<b>V</b>) como linfáticos (<b>L</b>).</p> |    |
| <b>Epitelio respiratorio</b>                  | <p>El epitelio respiratorio (<b>Er</b>) es pseudoestratificado; en la porción apical las células epiteliales presentan cilios. En su lámina propia (<b>Lp</b>) tiene glándulas mixtas.</p>  |  |
| <b>Acercamiento del epitelio respiratorio</b> | <p><b>C:</b> Cilios, <b>G:</b> células Goblet, <b>MB:</b> Membrana basal.</p>   |  |

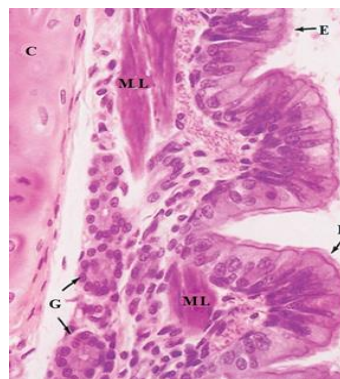
Tinción H y E, 200x. Adaptado de Mescher, 2011.

Tinción H y E, 200x. Adaptado de Caswell y Williams, 2016.

Tinción Tricrómica de Mallory, 400x. Adaptado de Mescher, 2011.

**Bronquio**

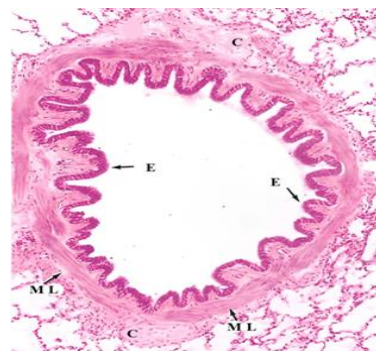
**E:** Epitelio respiratorio del bronquio, con cilios en la superficie. La lámina propia tiene una capa de músculo liso (**ML**) que rodea todo el bronquio y pequeñas glándulas serosas (**G**). En la submucosa se encuentra el cartílago hialino de sostén (**C**).



Tinción H y E, 400x. Adaptado de Mescher, 2011.

**Bronquiolo**

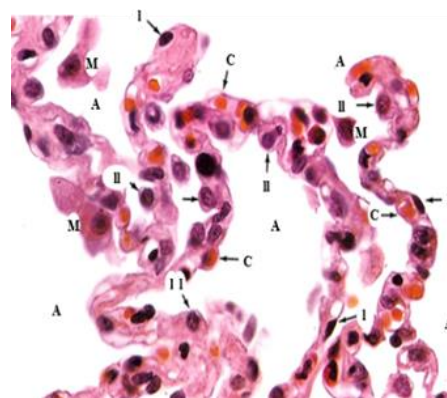
**E:** Epitelio respiratorio característicamente plegado y músculo liso prominente (**ML**) sostenido por tejido conectivo fibroso (**C**).



Tinción H y E, 140 x. Adaptado de Mescher, 2011.

**Paredes alveolares**

**A:** alvéolos revestidos por neumocitos tipo I (**I**), que recubren casi toda la superficie del alvéolo, y por neumocitos tipo II (**II**). También están presentes los macrófagos alveolares (**M**) y capilares sanguíneos (**C**).



Tinción H y E, 400x. Adaptado de Mescher, 2011.



**Tabla 2. Características histológicas del aparato respiratorio inferior.**

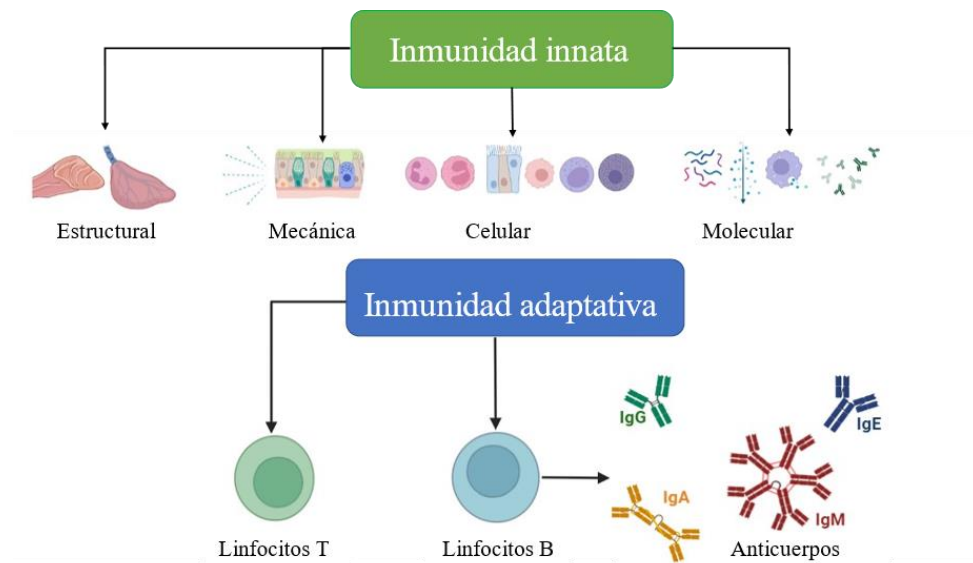
| <b>Región</b>                    | <b>Tipo de componente epitelial</b>                            | <b>Soporte musculoesquelético y glándulas presentes</b> | <b>Características y funciones</b>   |
|----------------------------------|--|---|--|
| <b>Bronquio</b>                  | Respiratorio   | Músculo liso y placas de cartílago hialino irregulares  | Conducción de aire.<br>BALT  |
| <b>Bronquiolo</b>                | Simple cuboidal a columnar ciliado, con células club exocrinas | Capa prominente de músculo liso                         | Conducción de aire   |
| <b>Bronquiolos terminales</b>    | Simple cuboidal, ciliado y células club.                       | Capa delgada de músculo liso                            | Conducción de aire a porciones respiratorias. Funciones protectoras y surfactantes |
| <b>Ductos y sacos alveolares</b> | Cúbico simple  | Bandas de músculo liso                                  | Intercambio gaseoso  |
| <b>Alvéolo</b>                   | Neumocitos tipo I y tipo II                                    | Red de fibras elásticas y reticulares                   | Intercambio gaseoso y funciones surfactantes                                       |

**BALT:** Tejido linfoide asociado a bronquios. Adaptado de Mescher, 2011.

Por último, la superficie exterior del pulmón y la pared interna de la cavidad torácica están cubiertas por una membrana serosa llamada pleura. La porción adherida al tejido pulmonar se llama pleura visceral y la porción que recubre las paredes torácicas se denomina pleura parietal. Ambas están compuestas por células mesoteliales escamosas simples sobre una fina capa de tejido conectivo que contiene colágeno y fibras elásticas. Las fibras elásticas de la pleura visceral se continúan con las del parénquima pulmonar (Mescher, 2011).

## 1.2. Mecanismos de defensa pulmonar

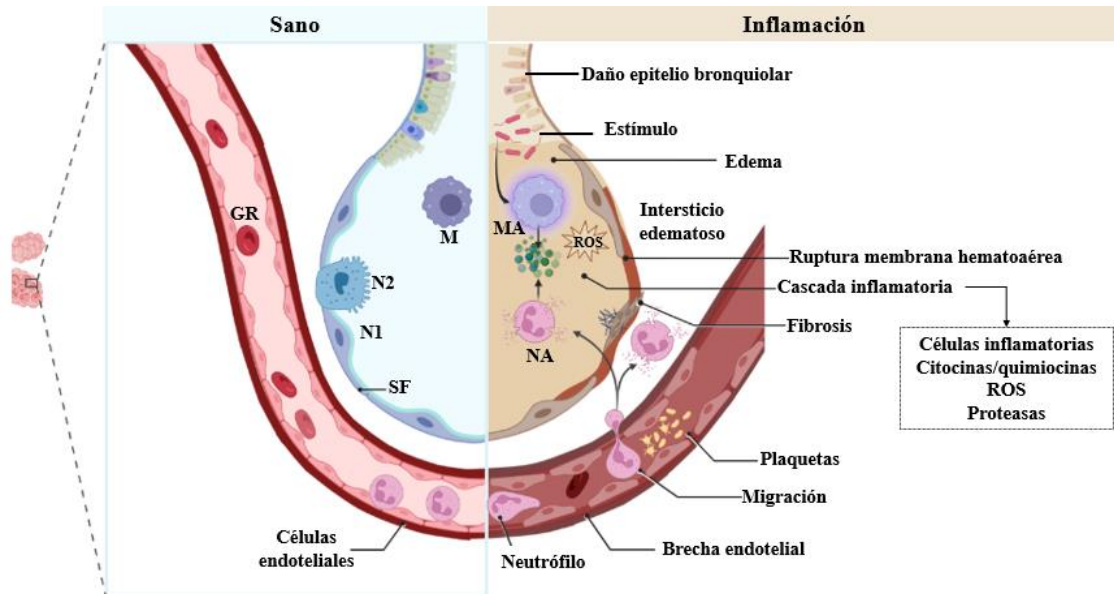
El pulmón se expone a patógenos, sustancias extrañas y gases nocivos, esto a través de la respiración, del contacto con el aparato digestivo y la vía hematógena. En un estado fisiológico sano, el parénquima pulmonar no se encuentra en un estado inflamatorio, lo cual pone en evidencia la eficacia del sistema de defensa pulmonar y el sistema de filtración del aire antes de que este llegue a los alvéolos. El desarrollo de los mecanismos de defensa pulmonar en respuesta a un antígeno será dependiente de la naturaleza del antígeno, la dosis y el tiempo de exposición, así como de las características intrínsecas del animal tales como el estado fisiológico, edad, nutrición, ambiente, etc. (Harkema *et al.*, 2010). Los principales mecanismos de defensa pulmonar incluyen la inmunidad innata (barreras físicas o anatómicas, células fagocíticas e inflamatorias y mecanismos moleculares), y la inmunidad adaptativa que incluye la respuesta celular y humoral (Figura 2). (Weinberger *et al.*, 2014).



**Figura 2. Mecanismos de defensa pulmonar.**

Las defensas del pulmón están mediadas por procesos complejos y a la vez complementarios que incluyen respuestas no inmunológicas e inmunológicas. Como parte del sistema inmunológico innato, las estructuras anatómicas que conforman el aparato respiratorio forman la primera línea de defensa pulmonar. El sistema mucociliar se encarga de eliminar las partículas de la superficie del epitelio respiratorio gracias a sus componentes mucoides y sus cilios móviles. A través de la tos y los estornudos también se pueden eliminar los agentes atrapados en el moco de las vías respiratorias; si el agente nocivo logra pasar estas defensas, se enfrentará a los mecanismos de defensa celulares, tanto inflamatorios como fagocíticos. Entre estos se encuentran las células que conforman el epitelio respiratorio, así como los macrófagos alveolares, neutrófilos, células NK (asesinas naturales), mastocitos, eosinófilos y células dendríticas. A través de las células NK, hay un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, que conduce a la defensa mediada por células, los linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos B son los responsables de crear anticuerpos específicos contra el patógeno (inmunidad mediada por anticuerpos). Creado en <https://app.biorender.com>

Cuando la respuesta inmune del hospedero no tiene éxito, y los patógenos bacterianos alcanzan los alvéolos, los mismos mecanismos de defensa (en especial los celulares) contribuyen al desarrollo de la inflamación pulmonar (Figura 3).



**Figura 3. Homeostasis pulmonar vs inflamación causada por bacterias.**

Los pulmones sanos mantienen el equilibrio entre el intercambio gaseoso y el transporte de sustancias, gracias a la integridad y función de la barrera hematoalveolar. Una vez que el patógeno entra al pulmón, los macrófagos alveolares y los neumocitos se activan, secretan citocinas y quimiocinas inflamatorias y reclutan más células inflamatorias. Las células inflamatorias pueden producir en exceso citocinas proinflamatorias, ROS (especies reactivas de oxígeno) y otros mediadores inflamatorios, generando tormentas de citocinas, estallido respiratorio y lesión pulmonar grave. El entorno inflamatorio puede dañar las células pulmonares, romper las uniones intercelulares, aumentar la permeabilidad vascular, romper la barrera hematoalveolar, etc. El deterioro de la barrera pulmonar puede provocar una mayor extravasación de células inflamatorias hacia los alvéolos, lo que puede exacerbar el estado inflamatorio y causar daño tisular, formando un círculo vicioso entre la cascada de inflamación y la ruptura de la barrera aire-sangre. **GR:** glóbulo rojo, **M:** macrófago, **N1:** neumocito tipo I, **N2:** neumocito tipo II, **SF:** surfactante, **MA:** macrófago activado, **ROS:** especies reactivas de oxígeno, **NA:** neutrófilo activado. Adaptado de Qiao *et al.*, 2021.

Creado en <https://app.biorender.com>

Una vez que se desencadena el evento inflamatorio en el pulmón, dependiendo del hospedero y del o de los microorganismos involucrados, el sistema inmunológico comienza la respuesta contra estos, generando procesos neumónicos. Los procesos neumónicos son las complicaciones respiratorias más comunes que enfrenta el ganado bovino; son la principal causa de muerte y uno de los aspectos más costosos que enfrenta este sector. A pesar de reconocer a los agentes virales como los principales causantes de neumonías, los agentes secundarios (bacterias) son los decisivos para el curso y evolución de las neumonías (Panciera y Confer, 2010).

### 1.3. Clasificación de neumonías en bovinos

La clasificación de las neumonías en bovinos es un tema bastante controversial y hasta la fecha no existe una clasificación universal. Sin embargo, la mayoría de los autores que clasifican los procesos neumónicos se basan en factores tales como patrones de lesión, etiología, apariencia, patrones histológicos, tipo de exudado, factores epidemiológicos, etc. Caswell y Williams, (2016) clasificaron las neumonías de acuerdo con diversos criterios (Tabla 3).

**Tabla 3. Clasificación de neumonías según Caswell y Williams (2016).**

| <b>Criterios</b>                | <b>Tipos</b>  |
|---------------------------------|---|
| <b>Histología</b>               | Fibrinosa, supurativa, granulomatosa, necrosante o proliferativa. |
| <b>Etiología</b>                | Viral, bacteriana, parasitaria, tóxica, alérgica.                 |
| <b>Duración</b>                 | Aguda, subaguda, crónica.   |
| <b>Anomalía funcional</b>       | Obstructiva y restrictiva.  |
| <b>Patrones epidemiológicos</b> | Lugar donde surge un brote.                                       |

Tomando en cuenta la distribución de las lesiones, la consistencia del órgano y el tipo de exudado, López y Martinson en el 2017, sugirieron clasificar macroscópicamente a las neumonías en 4 tipos: bronconeumonía, neumonía intersticial, neumonía embólica y neumonía granulomatosa (Tabla 4). De acuerdo con esta clasificación los autores sugieren también los posibles agentes causales, así como la vía de entrada del patógeno.

**Tabla 4. Clasificación de neumonías según López y Martinson (2017).**

| <b>Clasificación de neumonías</b> | <b>Distribución</b> | <b>Consistencia</b> | <b>Exudado</b>   | <b>Posible agente causal</b> | <b>Vía de entrada del patógeno</b> |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------------------|------------------------------------|
| <b>Bronconeumonía supurativa</b>  | Craneoventral       | Firme               | Purulento        | Bacterias                    | Aerógena                           |
| <b>Bronconeumonía fibrinosa</b>   | Craneoventral       | Firme               | Fibrinoso        | Bacterias                    | Aerógena                           |
| <b>Neumonía intersticial</b>      | Generalizada        | Elástica            | -                | Virus o tóxicos              | Aerógena o hematógena              |
| <b>Neumonía granulomatosa</b>     | Multifocal          | Firme a dura        | Granulomatoso    | Bacterias u hongos           | Hematógena o aerógena              |
| <b>Neumonía embólica</b>          | Multifocal          | Firme               | Focos purulentos | Bacterias                    | Hematógena                         |

Bajo estas condiciones, se establece que el daño al parénquima pulmonar varía según la naturaleza de los agentes causales, su distribución (particularmente relacionada con la vía de ingreso al pulmón) y su persistencia. Hasta que se establezca una nomenclatura universal y sistemática para la neumonía animal, se debe tomar en cuenta la lista heterogénea de nombres para las neumonías y considerar que un tipo de neumonía puede tener diferentes denominaciones.

#### **1.4. Principales bacterias involucradas en las neumonías en bovinos**

Una gran variedad de microorganismos pueden causar o contribuir al desarrollo de la neumonía en bovinos, incluidos virus, bacterias y hongos, ya sea individualmente o en

sinergia (Torres *et al.*, 2021). El Herpesvirus bovino-1 [BHV-1 (virus causante de la rinotraqueitis infecciosa bovina)], el virus de la parainfluenza-3 (PI-3) y el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) son reconocidos como patógenos respiratorios primarios en los bovinos (Arcangioli *et al.*, 2008; Panciera y Confer, 2010). Estos virus causan infección inicial en el parénquima pulmonar y permiten que bacterias oportunistas y/o patógenas, produzcan infecciones secundarias o actúen en sinergia. Las bacterias frecuentemente aisladas en estos procesos neumónicos son *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Histophilus somni* (*H. somni*), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) y *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) (Arcangioli *et al.*, 2008; Caswell y Williams, 2016).

Una vez que estas bacterias colonizan, provocan inflamación en el pulmón y se diseminan a través de las vías respiratorias contiguas o a través de componentes adyacentes del tejido pulmonar. Los factores de virulencia que expresa cada una de estas bacterias son responsables de la patogenicidad y del desarrollo de procesos neumónicos cuando el hospedero es susceptible (Trigo *et al.*, 2017; Panciera y Confer, 2010).

#### **1.4.1. *Mannheimia haemolytica***

*M. haemolytica* es una bacteria anaerobia facultativa Gram negativa perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Santos *et al.*, 2021). Tiene una estructura cocobacilar y su tamaño es aproximadamente de 0.2 µm por 2.0 µm. Al momento se han identificado 12 serotipos capsulares (1, 2, 5–9, 12–14, 16 y 17), la serotipificación de *M. haemolytica* depende de la variación en la cápsula de polisacáridos (Jaramillo *et al.*, 2017; Cozens *et al.*, 2019; O'Boyle *et al.*, 2020).

*M. haemolytica* forma parte de la microbiota nasofaríngea de bovinos sanos (Panciera y Confer, 2010; Singh *et al.*, 2011; López y Martinson, 2017; Figueroa *et al.*, 2022). Entre los serotipos más comúnmente identificados en procesos neumónicos se encuentra el A1, A6 y raramente el A2; este último serotipo se ha identificado con mayor frecuencia en bovinos sanos (Holman *et al.*, 2015, Klima *et al.*, 2014, Lam *et al.*, 2023). *M. haemolytica* es capaz de cambiar de un serotipo menos virulento a uno más virulento de acuerdo con los estímulos que reciba (Peek *et al.*, 2018).

Generalmente se acepta que los factores predisponentes, como el estrés ocasionado por el transporte, la presencia de agentes primarios u otras bacterias patógenas, el hacinamiento, el estado inmunológico del animal y el clima, permiten que *M. haemolytica* colonice el tracto respiratorio inferior. Esto da como resultado un grado variable de bronconeumonía fibrinosa que provoca hasta el 30% de mortalidad en terneros (Mahu *et al.*, 2015). La tasa de mortalidad puede superar el 50% cuando la infección con *M. haemolytica* se superpone a una infección viral preexistente. Aunque las probabilidades de desarrollar neumonía grave son

mayores cuando hay otros agentes, estos no son estrictamente necesarios para que *M. haemolytica* genere neumonía como patógeno primario (Peek *et al.*, 2018).

*M. haemolytica* expresa diferentes moléculas de superficie que permiten la interacción con células epiteliales del aparato respiratorio del hospedero (Figuroa *et al.*, 2022). Entre estas moléculas de superficie se encuentran adhesinas específicas que median la unión de *M. haemolytica* a las células epiteliales bronquiales. Estas incluyen la O-sialoglicoproteína que media la adherencia a las células epiteliales traqueales y activa el estallido oxidativo de los neutrófilos bovinos, la proteína A de membrana externa (OmpA), la lipoproteína 1 de superficie (LPP1) y la neuraminidasa que se une al fibrinógeno (Kisiela y Czuprynski, 2009; Cozens *et al.*, 2019). La cápsula puede funcionar también como una adhesina y cuenta con propiedades antifagocíticas (Rice *et al.*, 2007; Klima *et al.*, 2014).

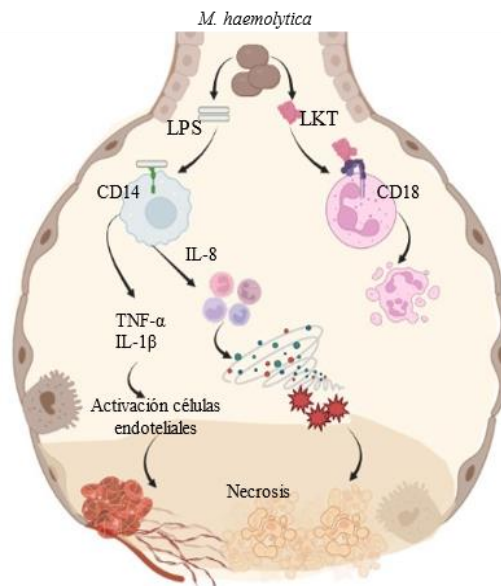
Una vez establecida en los pulmones, *M. haemolytica* causa lesiones por medio de la expresión de diferentes factores de virulencia, que incluyen el lipopolisacárido (LPS), proteínas fijadoras de hierro, enzimas secretadas y una toxina que pertenece a la familia de toxinas repetidas (RTX) específica de rumiantes, la leucotoxina (LKT) (Rice *et al.*, 2007; López y Martinson, 2017). El LPS y la LKT son los dos factores responsables de la mayoría de las lesiones destructivas del pulmón y además, actúan en sinergia (Panciera y Confer, 2010).

Los efectos patológicos del LPS sobre el pulmón pueden ser mediados por su interacción con el receptor CD14 de los macrófagos alveolares, lo que induce que éstos produzcan citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF $\alpha$ , así como especies reactivas de nitrógeno (NOS), ROS y otros mediadores proinflamatorios como leucotrienos y prostaglandina E2 (Singh *et al.*, 2011). Posteriormente, estas citocinas proinflamatorias y mediadores quimiotácticos inician el reclutamiento de neutrófilos, los cuales producen más citocinas inflamatorias, activan la cascada del complemento, generan coagulación y producen citólisis directa (Cai *et al.*, 2020; Snyder y Credille, 2020). La producción de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  induce la activación de células endoteliales, lo que genera edema y acumulación de fibrina por el daño del endotelio vascular (Snyder y Credille, 2020). Otros efectos sistémicos inducidos por el LPS incluyen fiebre y producción de proteínas de fase aguda por parte del hígado (Rice *et al.*, 2007).

Por otro lado, la LKT es una proteína termolábil soluble, cuyos efectos son específicos para macrófagos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas de rumiantes, al interactuar específica y selectivamente con el receptor CD18 de estas células (Jeyaseelan *et al.*, 2002; Snyder y Credille, 2020). La LKT tiene un efecto dosis dependiente: a bajas concentraciones, induce el estallido respiratorio, desgranulación de macrófagos, mastocitos y neutrófilos, induciendo la liberación de citocinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-8) (Deshpande *et al.*, 2002); a concentraciones más altas, induce apoptosis y la formación de poros transmembranales en leucocitos (Oppermann *et al.*, 2017). Los poros formados en los leucocitos provocan la fuga de productos del estallido respiratorio, tales como ROS y óxido nítrico, así como enzimas

lisosomales (incluida la mieloperoxidasa) y metabolitos del ácido araquidónico (Figura 4). La liberación de estos componentes al medio afecta el tejido pulmonar circundante provocando graves daños vasculares e incluso necrosis (Snyder y Credille, 2020).

La neumonía causada por *M. haemolytica* se caracteriza por disminución de la función inmunitaria innata, disfunción del epitelio de las vías respiratorias y la entrada de factores inflamatorios en las vías respiratorias. A medida que la infección avanza, se manifiestan los signos clínicos: comienzan con pérdida de apetito, depresión, secreciones oculares y nasales mucopurulentas, fiebre (hasta 42°C), tos húmeda y taquipnea (Santos *et al.*, 2021).



**Figura 4. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y la leucotoxina (LKT) de *M. haemolytica*.**

El LPS interactúa con el antígeno receptor CD14 de macrófagos, con lo que se libera IL-8 que funciona como quimioatrayente para los neutrófilos y otras células inflamatorias, y generando por tanto una tormenta de citocinas y el estallido respiratorio. A su vez, la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  genera la activación de las células endoteliales, esto da como resultado fugas vasculares, generando edema y acumulación de fibrina por el daño del endotelio vascular. Todos estos mediadores liberados por el estímulo de los dos antígenos de *M. haemolytica* generan un ambiente inflamatorio severo que favorece el daño pulmonar. La LKT interactúa específicamente con el receptor CD18 en la superficie de neutrófilos, macrófagos, plaquetas y linfocitos. Una vez en contacto, puede generar citólisis o promover la degranulación de neutrófilos para que liberen potentes enzimas digestivas en el tejido circundante. Modificado de Snyder y Credille, 2020. Creado en <https://app.biorender.com>

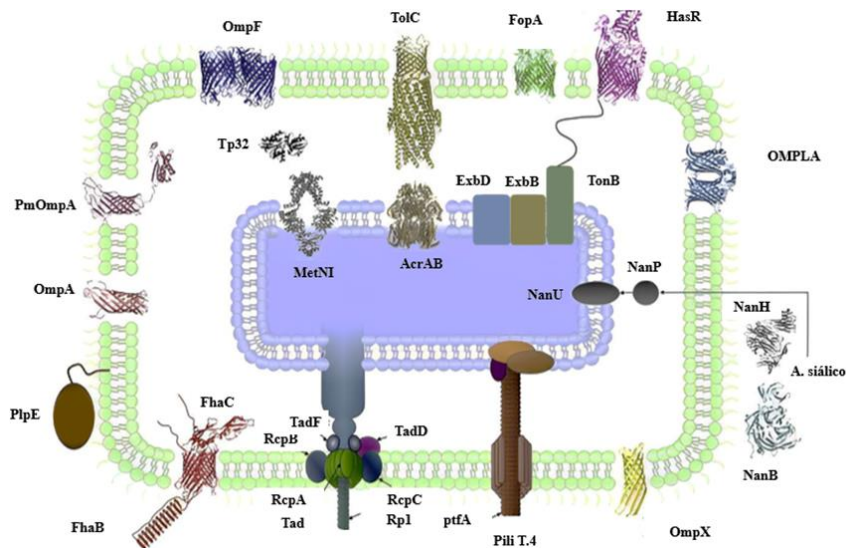


### 1.4.2. *Pasteurella multocida*

*P. multocida* es una bacteria Gram negativa, no móvil, que al igual que *M. haemolytica*, forma parte de la familia *Pasteurellaceae* (Shirzad y Tabatabaei, 2016; Klima *et al.*, 2020). Su morfología es cocobacilar y mide de 0.3 a 1.0  $\mu\text{m}$  por 1.0 a 2.0  $\mu\text{m}$  (Hatfaludi *et al.*, 2010). Se considera uno de los patógenos comensales y oportunistas más prevalentes en todo el mundo y uno de los más importantes relacionados con neumonía en bovinos (Su *et al.*, 2020). *P. multocida* es ubicua y se puede encontrar tanto en ganado sano como enfermo; no todos los terneros que albergan o están expuestos a la bacteria desarrollarán neumonía (Dabo *et al.*, 2007).

*P. multocida* es una bacteria con cápsula, la cual es un componente estructural esencial y un factor de virulencia importante, ya que su capacidad infecciosa está estrechamente relacionada con el tipo capsular (Guan *et al.*, 2019). Existen cinco tipos capsulares (A, B, D, E y F) (Shirzad y Tabatabaei, 2016; Snyder y Credille, 2020). El principal componente del tipo A es el ácido hialurónico, del tipo B la arabinosa, manosa y galactosa, del tipo D es la heparina y del tipo F es la condroitina; se desconoce la composición química de la cápsula del tipo E (Townsend *et al.*, 2001). El tipo capsular más aislado en bovinos sanos y con enfermedades respiratorias es el A (Ewers *et al.*, 2006; Calderón *et al.*, 2022). En procesos neumónicos también se han reportado los tipos capsulares B, D y F, aunque en menor frecuencia (Ewers *et al.*, 2006; Calderón *et al.*, 2022). En el pulmón, la cápsula le permite a este patógeno evadir la fagocitosis, así como resistir a la lisis mediada por complemento (Harper *et al.*, 2006).

La patogenicidad de *P. multocida* está asociada a los diferentes factores de virulencia y su interacción con el hospedero (Aski y Tabatabaei, 2016). Entre estos se encuentran las fimbrias, factores de adherencia y colonización, sistemas de adquisición de hierro, enzimas extracelulares como la neuraminidasa, hialuronidasa y superóxido dismutasa, y una gran variedad de proteínas de membrana externa (Figura 5).



**Figura 5. Membrana externa y proteínas asociadas de *P. multocida*.**

**Proteínas de transporte:** OmpF (porina no específica), TolC y AcrAB (bomba de eflujo), Tp32 y MetNI (sistema transportador de metionina). **Proteínas de unión:** FepA y HasR (captación de hierro). **Enzimas asociadas a la membrana:** OMPLA (fosfolipasa), NanH y NanB (sialidasas). **Adhesinas:** OmpX, Pili tipo 4, Tad y FhaB (hemaglutinina filamentosa). **Ensamblaje de proteínas:** FhaC. Membrana interna (azul); membrana externa (verde) Adaptado de (Hatfaludi *et al.*, 2010).

Las adhesinas importantes para mediar la unión a las células del hospedador y a la matriz extracelular son PtfA (fimbrias tipo 4), ComE1 (unión a fibronectina) y las hemaglutininas FhaB1 y FhaB2 (Hatfaludi *et al.*, 2010). Las enzimas sialidasas actúan para eliminar el ácido siálico de las proteínas y lípidos glicosilados del hospedero para su uso como fuente de carbono (Harper *et al.*, 2006).

El factor de virulencia más importante con respecto a las lesiones pulmonares es el lipopolisacárido o endotoxina; las cepas de *P. multocida* se clasifican en 16 serotipos con base en los antígenos del LPS (Aski y Tabatabaei 2016; Peng *et al.*, 2019). El lípido A es el componente endotóxico del LPS y estimula fuertemente tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa. El LPS funciona como patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) que es reconocido por varios receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo Toll (TLR). El LPS interactúa con el receptor CD14 en la superficie de los fagocitos; esta interacción da como resultado la liberación de citocinas proinflamatorias (Harper *et al.*, 2006; Snyder y Credille, 2020). Además, la exposición a la endotoxina aumenta la expresión de CD18 en la superficie de las células inflamatorias, lo que resulta en la atracción de más células y esto en conjunto genera un ambiente inflamatorio en el pulmón que se exagera si no se elimina el patógeno, lo que provoca el daño al tejido pulmonar (Snyder y Credille, 2020).

La neumonía ocasionada por este patógeno se reconoce como bronconeumonía supurativa, aunque puede progresar a bronconeumonía fibrinosa, precisamente por la capacidad de su LPS para generar daño vascular al igual que *M. haemolytica*, generando congestión, hemorragias, edema y necrosis (López y Martinson, 2017). Los criterios de diagnóstico son a menudo vagos, pero típicamente incluyen depresión, inapetencia, tos, descarga nasal y fiebre o alguna combinación de estos (Dabo *et al.*, 2007).

### **1.4.3. *Histophilus somni***

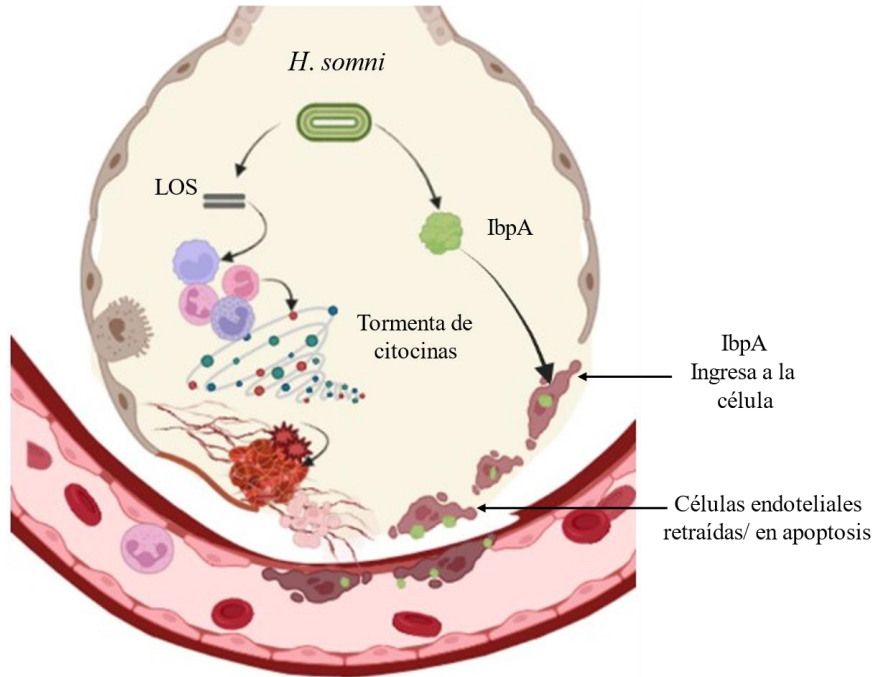
*Histophilus somni* es un cocobacilo Gram negativo pleomórfico, no encapsulado, anaerobio facultativo, no móvil (Siddaramppa e Inzana, 2004). Al igual que *M. haemolytica* y *P. multocida*, forma parte de la familia *Pasteurellaceae*; puede o no formar parte de la microbiota del tracto respiratorio superior de los bovinos (Delano *et al.*, 2002; McMullen *et al.*, 2020). *H. somni* es un patógeno oportunista relacionado con varias enfermedades en bovinos, entre ellas, los procesos neumónicos. Esta bacteria puede provocar tanto bronconeumonía supurativa como bronconeumonía fibrinosa (López y Martinson, 2017).

El daño al parénquima pulmonar ocasionado por *H. somni* se debe a varios factores de virulencia, tales como el exopolisacárido, proteína de unión a inmunoglobulina A (IbpA) y proteínas de membrana externa (Tagawa *et al.*, 1993; Miller y Gal, 2017). Los más importantes son la proteína IbpA y el lipooligosacárido (LOS), que es un tipo de LPS pero sin el antígeno O (Siddaramppa e Inzana, 2004).

El LOS de *H. somni* puede desencadenar variación antigénica y evitar que la bacteria sea reconocida por el sistema inmunológico del hospedero, ya que bloquea la unión de anticuerpos y permite escapar de la fagocitosis (Miller y Gal, 2017). Se cree que esta variación antigénica está asociada con la sialilación de la fosforilcolina del núcleo externo del LOS. Además de esto, el LOS también induce apoptosis de las células endoteliales, contribuyendo así a las lesiones vasculares (Siddaramppa e Inzana, 2004).

Por otro lado, IbpA es liberada de la superficie bacteriana, posteriormente se internaliza en las células del epitelio respiratorio y adenila e inactiva las GTPasas Rho de las células del hospedero, lo que provoca el colapso del citoesqueleto; la célula entonces se redondea y se retrae (apoptosis) (Zekarias *et al.*, 2010). La manifestación de la neumonía ocasionada por esta bacteria se debe en gran medida a la respuesta inflamatoria del hospedero a estos factores de virulencia, en especial LOS e IbpA que provocan vasculitis y muerte de las células endoteliales (Siddaramppa e Inzana, 2004; Hellenbrand *et al.*, 2013).

El mecanismo de infección de *H. somni* no se conoce del todo; se especula de acuerdo con los factores de virulencia que se han descubierto (Figura 6). Los signos clínicos que producen la infección con este microorganismo incluyen disnea y fiebre persistente; si no se detecta y se trata a tiempo, la mayoría de los casos terminan en la muerte del individuo (Shirbroun, 2020).



**Figura 6. Efecto de los factores de virulencia de *H. somni*.**

El lipooligosacárido (LOS) estimula a las células inflamatorias y provoca la degranulación de neutrófilos que liberan potentes enzimas lisosomales en el tejido circundante; se genera una tormenta de citocinas y el estallido respiratorio. IbpA se internaliza en los neumocitos y en las células del endotelio vascular y provoca su retracción y debido a la inactivación de las GTPasas Rho celulares, también genera apoptosis. Las bacterias pasan entre las células alveolares retraídas.

Estos factores de virulencia propician un proceso inflamatorio exacerbado que genera daño al endotelio vascular lo que promueve la formación del edema y acumulación de fibrina. Además, el cruce de la barrera hematoaérea puede dar como resultado la entrada de *H. somni* en la circulación, generando así septicemia. Adaptado de Zekarias *et al.*, 2010. Creado en <https://app.biorender.com>

#### 1.4.4. *Trueperella pyogenes*

*T. pyogenes*, previamente clasificada como *Arcanobacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes* y *Corynebacterium pyogenes*, pertenece a la familia *Actinomycetaceae*. Es una bacteria Gram positiva, pleomórfica, no formadora de esporas, inmóvil, no encapsulada, anaerobia facultativa, que se caracteriza por tener metabolismo fermentativo y fuerte actividad proteolítica (Zhang *et al.*, 2013).

Este microorganismo es un patógeno oportunista importante en el desarrollo de neumonías en bovinos, siendo uno de los agentes etiológicos de bronconeumonía supurativa que puede generar abscesos pulmonares (Zhao *et al.*, 2011; López y Martinson, 2017). Además de invadir las células del hospedero, tiene la capacidad de crear biopelículas (Zhang *et al.*, 2013).

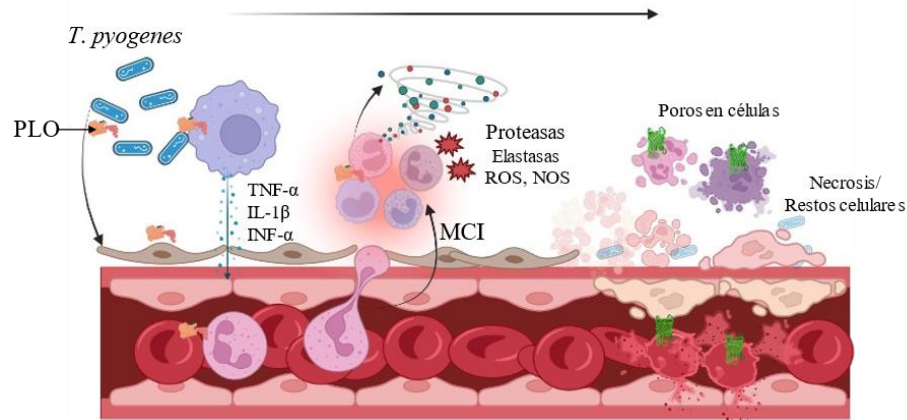
Entre los factores de virulencia de *T. pyogenes* se incluyen una exotoxina con actividad hemolítica llamada piolisina (PLO), factores de adhesión como las fimbrias (FimA, FimB, FimC, FimE y FimG) (Rzewuska *et al.*, 2019), neuraminidasas (NanH, NanP) y una proteína de unión a colágeno (CbpA), así como diferentes exoenzimas, tales como proteasas de serina con actividad gelatinasa y caseinasa.

PLO se considera el factor de virulencia más importante. El gen *plo* que codifica para esta exotoxina, se encuentra en una isla de patogenicidad, lo que sugiere su transferencia horizontal (Moreno *et al.*, 2017). PLO pertenece a las citolisinas dependientes del colesterol (CDC) (Abdulmawjood *et al.*, 2016), lo que significa que su actividad citolítica está asociada con su capacidad para unirse a la membrana plasmática, donde posteriormente formará poros transmembranales (Risseti *et al.*, 2017).

Inicialmente las moléculas de PLO se secretan al entorno extracelular en forma de monómeros solubles en agua. El dominio 4 (D4) es el encargado del reconocimiento y la unión a la membrana celular del hospedero y los dominios 2 y 3 (D2 y D3) favorecen la posterior oligomerización e inserción del monómero en la membrana plasmática, así como la formación de estructuras en forma de arco incompletas, llamadas preporo (Urumuva *et al.*, 2009; Rogovskyy *et al.*, 2018). Posteriormente, los oligómeros de PLO se insertan en la bicapa mediante las horquillas  $\beta$  transmembrana del dominio 3, lo que conduce a la formación de un gran poro de barril  $\beta$  transmembranal por encima de la membrana plasmática. Como consecuencia, este proceso conduce a la pérdida de iones y otras moléculas citoplasmáticas y finalmente a la lisis de la célula del hospedero (Hijazin *et al.*, 2011; Rzewuska *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que PLO tiene efecto citotóxico sobre los neutrófilos, macrófagos, células epiteliales y eritrocitos; el dominio 1 (D1) de PLO es necesario para la actividad hemolítica (Tamai *et al.*, 2022).

Las interacciones patógeno-hospedero en la neumonía causada por *T. pyogenes* aún no se comprenden del todo por lo que la patogenia de la infección sigue sin explicarse

completamente; se plantea que este patógeno actúa en sinergia con otras bacterias y esto genera el daño tan severo (Figura 7).



**Figura 7. Posible patogenicidad de las infecciones por *T. pyogenes*.**

*T. pyogenes* libera su toxina PLO y con ello puede generar citólisis a través de la formación de poros en la membrana de varias células. Los macrófagos alveolares se activan y liberan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF- $\alpha$  que funcionan como quimioatrayente para los neutrófilos y otras células inflamatorias. Al reclutar más células inflamatorias, se genera una tormenta de citocinas y el estallido respiratorio. Los mediadores liberados por el estímulo de *T. pyogenes* desencadenan un proceso inflamatorio grave, generando daño irreversible al parénquima pulmonar. En un intento del sistema inmunológico por contener la infección, se pueden generar abscesos, que contienen neutrófilos viables o degenerados (piocitos), restos de tejido y bacterias vivas. MCI: migración de células inflamatorias. Adaptado de Rzewuska *et al.*, 2019. Creado en <https://app.biorender.com>

#### 1.4.5. *Mycoplasma bovis*

Los organismos del género *Mycoplasma* pertenecen a la clase Mollicutes que se caracterizan por la falta de pared celular y en su lugar, están envueltos por una compleja membrana plasmática (Maunsell y Donovan, 2009); la mayoría mide entre 0.1 y 0.8  $\mu\text{m}$  (Sykes, 2013). El genoma de *M. bovis* es muy pequeño, ya que aproximadamente consta de 0.58 a 2.2 megabases (Maunsell y Donovan, 2009); debido a esto se cree que su capacidad biosintética es limitada, por lo que suele formar una asociación íntima con las células del hospedero para cubrir sus requisitos metabólicos y sobrevivir (Caswell *et al.*, 2010). Las interacciones entre *M. bovis* y el hospedero son bastante complejas y no se conocen del todo (Dawood *et al.*, 2022).

*M. bovis* es uno de los patógenos más importantes relacionados con los procesos neumónicos en bovinos; este patógeno oportunista puede generar bronconeumonía supurativa con centros multifocales de necrosis caseosa (Maunsell y Donovan, 2009; Becker *et al.*, 2020). Aunque

se sigue investigando el origen de las lesiones caseonecróticas, se cree que las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (NOS) y la acción de la NADH oxidasa (NOX) son los principales contribuyentes a la lesión celular en el pulmón (López y Martinson, 2017). Se considera que los factores relacionados con la virulencia de *M. bovis* incluyen aquellos que le permiten la adhesión y la invasión, así como la interacción con la inmunidad innata y adquirida del hospedero (Dawood *et al.*, 2022).

La adhesión es el primer paso de la infección por *M. bovis*, mediada principalmente por proteínas de la membrana celular. Hasta el momento se han identificado 16 proteínas de unión a las células del hospedero (Xu *et al.*, 2022); entre las más estudiadas se encuentran la  $\alpha$ -enolasa, NOX, metilnotetrahidrofolato-tRNA-(uracil-5-)-metiltransferasa (TrmFO), lipoproteínas de superficie variable (Vsps), proteína pMB67 y p26 (Josi *et al.*, 2019).

Una vez que *M. bovis* se adhiere a las superficies celulares puede ingresar a las células; se ha reportado que puede invadir células mononucleares de sangre periférica, eritrocitos y epitelio respiratorio, aunque en el epitelio respiratorio puede permanecer en la superficie (entre los cilios) sin producir ciliostasis (Caswell *et al.*, 2010; Nunoya *et al.*, 2020).

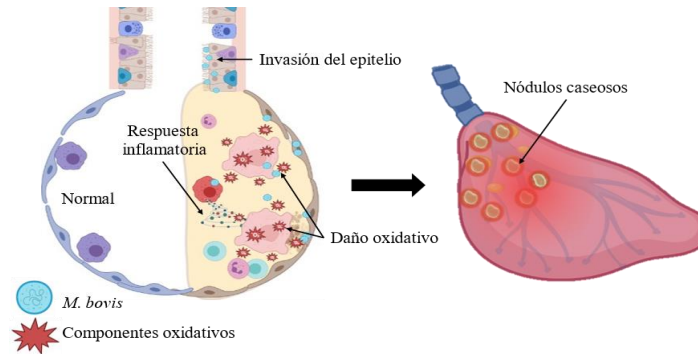
*M. bovis* puede inducir una amplia gama de eventos inmunomoduladores por efectos directos sobre macrófagos, neutrófilos y linfocitos, y por efectos indirectos a través de la inducción de la secreción de citocinas. No se comprende todavía la interacción precisa de estos eventos en el pulmón; se han reportado más de 50 genes que se relacionan con la virulencia de este patógeno y aunque las investigaciones son amplias, no se conoce el mecanismo exacto de cada uno de estos factores (Francoz *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2016).

Las lipoproteínas variables de superficie de membrana o VSP, son los factores de virulencia mejor caracterizados de *Mycoplasma*. Estas lipoproteínas, son antígenos de superficie inmunodominantes; en *M. bovis* se han identificado 13 VSP: vspE, vspI, vspO, vspJ, vspN, vspK, vspL, vspM, vspB, vspG, vspA, vspH y vspF (Schott *et al.*, 2014). En general, las VSP varían entre sí en tamaño y antigenicidad; un complejo sistema genético determina cuál de ellas se expresará en respuesta a los estímulos percibidos. Esta variación genera por tanto diferentes patrones resultantes de VSP, que permiten que *M. bovis* se adapte a diferentes condiciones y se adhiera a diferentes tipos de células, además de permitirle evadir al sistema inmune del hospedero (Parker *et al.*, 2016).

Entre otros factores de virulencia se encuentra la enzima NOX, que puede oxidar NADH a NAD<sup>+</sup> y reducir O<sub>2</sub> para producir peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de modo que forma radicales libres de oxígeno y provoca la peroxidación de los lípidos de la célula del hospedero causando daño oxidativo al pulmón y la muerte celular (Caswell *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2017). *M. bovis* también expresa dos nucleasas, MnuA y la nucleasa secretora MBOV\_RS02825, las cuales están asociadas con la citotoxicidad y con la degradación de las trampas extracelulares de neutrófilos (Josi *et al.*, 2019).

La inflamación en el parénquima pulmonar parece ocurrir a través de macrófagos, células T y la activación del complemento en respuesta a los epítomos antigénicos de *M. bovis* (Figura 8) (Zhao *et al.*, 2017).

Los signos clínicos en los animales infectados con *M. bovis* son muy inespecíficos; típicamente se reporta fiebre, pérdida de apetito, secreción nasal, tos, aumento de la frecuencia respiratoria, esfuerzo inspiratorio y pueden ocurrir casos simultáneos de otitis media y artritis (Maunsell y Donovan, 2009).



**Figura 8. Daño pulmonar causado por *M. bovis*.**

*M. bovis* se adhiere al epitelio respiratorio y puede ingresar a las células o permanecer entre los cilios. A partir de la colonización del epitelio respiratorio puede migrar a los alvéolos y una vez reconocida, se desencadena la respuesta inflamatoria. El hospedero destruye localmente su propio tejido para controlar la multiplicación de la bacteria. Además, por acción de la NOX se liberan componentes oxidativos en el parénquima pulmonar; estos componentes generan necrosis caseosa del tejido, la cual es rodeada por fibras elásticas para contenerla, de ahí la formación de áreas multifocales de necrosis caseosa (Caswell *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2017). Creado en

<https://app.biorender.com>

## 2. ANTECEDENTES

En México sólo 5 estudios han investigado y reportado casos de neumonías en ganado bovino (Figura 9) los cuales se describen brevemente a continuación.

Pijoan *et al.* (1999) realizaron un estudio en 12 establos de vacas lecheras en Tijuana, Baja California, en los que a 100 becerras con signos clínicos de neumonía se les realizó el examen *postmortem* y se les tomaron muestras de pulmón. *P. multocida* se encontró en 34 casos, *M. haemolytica* en 31 y *H. somni* en 11 casos.

De la Rosa *et al.* (2012) realizaron un estudio descriptivo en el que evaluaron la frecuencia de *M. haemolytica* y *P. multocida* en becerras en un complejo lechero del estado de Hidalgo. Estos autores tomaron hisopados nasales de 239 becerras con signos clínicos de neumonía,

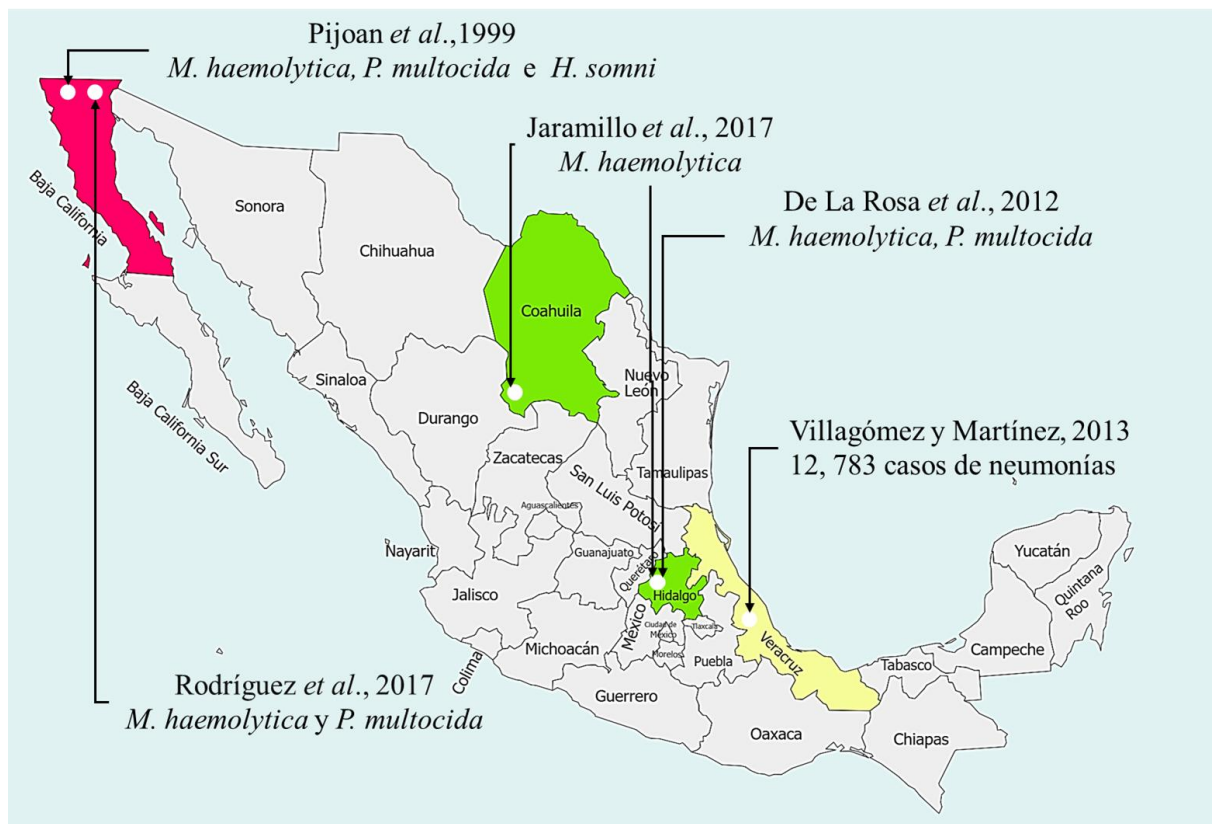


cultivaron las muestras y reportaron que de 239 casos, 67 fueron positivos para *M. haemolytica* y 17 para *P. multocida*.

Villagómez y Martínez (2013) realizaron una evaluación epidemiológica en un corral de engorda ubicado en Tierra Blanca, Veracruz. En este estable recibían ganado proveniente de Oaxaca, Chiapas, el sur de Veracruz y Tabasco. En su estudio documentaron la entrada de animales durante un año, sumando un total de 260,211 registros; de estos, encontraron 12,783 becerros con signos clínicos de neumonía. Los animales más afectados fueron los que recorrían más distancia para llegar al corral (animales provenientes de Chiapas) y enfatizaron que el transporte es un factor predisponente para el desarrollo de neumonía debido al estrés que genera en los animales. A pesar de esta información, los autores no realizaron pruebas para reportar los patógenos involucrados en la neumonía.

Jaramillo *et al.* (2017) realizaron la ribotipificación de 106 aislados de *M. haemolytica* obtenidos de exudado nasal de bovinos clínicamente sanos (n= 80) y con neumonía (n= 26). Los animales provenían de Tizayuca, Hidalgo, y Torreón, Coahuila. No se encontraron diferencias entre cepas de *M. haemolytica* independientemente del origen de éstas y del estado de salud de los animales. Este estudio se limitó a una sola especie bacteriana, sin embargo, se demostró la incidencia de este patógeno en distintos estados, tanto en animales sanos como en animales con neumonía.

Rodríguez *et al.* (2017) obtuvieron hisopados nasales de 88 bovinos con signos clínicos de neumonía procedentes de distintos estados (Chiapas, Chihuahua, Guerrero, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas) confinados en un corral de engorda de Mexicali, Baja California. Se realizaron pruebas moleculares (PCR y RT-PCR) con el objetivo de conocer la prevalencia de agentes causales. 70 casos fueron positivos para *M. haemolytica* y 60 para *P. multocida*. Aunque la prevalencia de estas bacterias es alta para el número de casos, el agente más prevalente fue el virus respiratorio sincitial bovino en 80.6% (71 bovinos). Si bien solo dos especies bacterianas fueron evaluadas, este estudio aporta información de interés en los procesos neumónicos en bovinos para futuros análisis epidemiológicos.



**Figura 9. Estados de la República Mexicana donde se han reportado neumonías en bovinos.** Con distintos colores se resaltan los estados en donde se han realizado estudios sobre los procesos neumónicos en bovinos, así como los autores de dichos estudios y los patógenos bacterianos que reportaron. Elaboración propia en <https://paintmaps.com>

A pesar de que los estudios anteriormente descritos dan indicios de la situación de los procesos neumónicos en bovinos, en México no hay registros actualizados o más reportes en otras partes del país.

Los países que han reportado pérdidas económicas ocasionadas por neumonías toman en cuenta que aproximadamente 25% de los becerros experimentan al menos un episodio de enfermedad respiratoria durante el primer año de vida (Kumar *et al.*, 2020). Los costos se basan en las tasas de morbilidad y mortalidad, el costo de la prevención, el tratamiento farmacológico, la reducción de la productividad y el valor de las canales. En 2018 la Unión Europea reportó que la pérdida económica debido a las neumonías en bovinos fue de 576 millones de euros anualmente, mientras que Estados Unidos reportó 4 billones de dólares al año (Kurčić *et al.*, 2018).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las neumonías en bovinos son una de las principales causas de morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas en la industria del ganado cárnico y lechero en todo el mundo; en México son la segunda enfermedad más común en los bovinos lecheros y cárnicos (Panciera y Confer, 2010; Rodríguez *et al.*, 2017).

En lo que concierne a los productos lácteos, en el año 2021 México ocupó el 15° lugar en producción de leche, que es el tercer producto pecuario más importante en la economía mexicana aportando el 17.22 % al producto interno bruto (SIAP, 2022). Debido a la importancia que tienen los productos lácteos en el consumo humano y en la economía mexicana, se hacen necesarios los estudios constantes y actualizados de las enfermedades que afectan a los bovinos, y que pueden impactar en la producción de productos de consumo humano, así como la identificación de los agentes etiológicos de dichas enfermedades.

En México no existen registros públicos que permitan conocer la incidencia de las neumonías en los bovinos, ni estudios que indiquen su situación actual o la frecuencia de los agentes causales que se han asociado con estos procesos. Si bien las neumonías en bovinos son un problema multifactorial, la participación de las bacterias como agentes secundarios es un factor decisivo para el curso y pronóstico de la enfermedad. A este respecto, como ya se mencionó, los estudios previos realizados en México que se relacionan con las neumonías en bovinos son limitados en cantidad y se han acotado a la detección de *M. haemolytica* y *P. multocida* a partir de exudados nasales y cultivos bacterianos.

El presente estudio pretende identificar a los principales agentes bacterianos asociados a neumonías bovinas, tales como *M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), así como describir y clasificar las diferentes lesiones macro y microscópicas que causan estos agentes en los pulmones de bovinos, mediante el estudio *post mortem* y el análisis histopatológico.

### 4. HIPÓTESIS

*M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes* no producen lesiones pulmonares macroscópicas y microscópicas características para distinguirlos entre sí, pero pueden ser identificados mediante PCR a partir de pulmones con neumonía. Habrá alta incidencia de *M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes* en los pulmones de bovinos que cursen con neumonía.

### 5. OBJETIVOS

### **5.1. Objetivo general**

Identificar por medio de PCR a *M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes* en muestras de órganos de bovinos con signos clínicos de neumonía, así como describir y clasificar las diferentes lesiones pulmonares macro y microscópicas que estos agentes producen.

### **5.2. Objetivos específicos**

1. Describir y clasificar macro y microscópicamente las lesiones pulmonares de bovinos que hayan presentado cuadro neumónico compatible con infecciones por *M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes*.
2. Realizar la extracción de ácidos nucleicos a partir de las muestras de pulmones tomadas durante las necropsias de bovinos con signos clínicos de neumonía.
3. Implementar un protocolo de detección por PCR de *M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes*.
4. Analizar, comparar y relacionar los hallazgos histopatológicos y moleculares.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Animales de estudio**

Se seleccionaron 38 bovinos con antecedentes clínicos de neumonía, provenientes del Centro de Enseñanza y Diagnóstico de Enfermedades en Bovinos (CEDEB) ubicado en Tizayuca, Hidalgo. La tabla 5 muestra los 38 casos con el número asignado en el Centro. En adelante, los casos se mencionarán por número de caso (Tabla 5).

**Tabla 5. Registro de bovinos.**  
Identificación de los bovinos que presentaron cuadros neumónicos.

| <b>Número de caso</b> | <b>Clave del CEDEB</b> | <b>Edad</b> | <b>Número de caso</b> | <b>Clave del CEDEB</b> | <b>Edad</b> |
|-----------------------|------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|-------------|
| <b>1</b>              | <b>T16-010</b>         | 6 meses     | <b>21</b>             | <b>T19-090</b>         | 5 meses     |
| <b>2</b>              | <b>T16-018</b>         | 7 meses     | <b>22</b>             | <b>T19-094</b>         | 1 mes       |
| <b>3</b>              | <b>T16-062</b>         | 1 mes       | <b>23</b>             | <b>T19-099</b>         | 4 meses     |
| <b>4</b>              | <b>T16-284</b>         | 1 mes       | <b>24</b>             | <b>T19-105</b>         | 4 meses     |
| <b>5</b>              | <b>T16-286</b>         | 1 mes       | <b>25</b>             | <b>T19-106</b>         | -           |
| <b>6</b>              | <b>T17-071</b>         | 1 mes       | <b>26</b>             | <b>T19-110</b>         | 1.5 meses   |
| <b>7</b>              | <b>T17-153</b>         | 1 año       | <b>27</b>             | <b>T19-112</b>         | 4 meses     |
| <b>8</b>              | <b>T18-101</b>         | 3 meses     | <b>28</b>             | <b>T19-116</b>         | 1 mes       |
| <b>9</b>              | <b>T18-118</b>         | -           | <b>29</b>             | <b>T19-119</b>         | 3 meses     |
| <b>10</b>             | <b>T18-145</b>         | 3 meses     | <b>30</b>             | <b>T19-122</b>         | 3 meses     |
| <b>11</b>             | <b>T18-146</b>         | -           | <b>31</b>             | <b>T19-123</b>         | 1 mes       |
| <b>12</b>             | <b>T18-147</b>         | 1 mes       | <b>32</b>             | <b>T19-129</b>         | 3 meses     |
| <b>13</b>             | <b>T19-026</b>         | -           | <b>33</b>             | <b>T19-179</b>         | 1.5 meses   |
| <b>14</b>             | <b>T19-032</b>         | 5 meses     | <b>34</b>             | <b>T19-229</b>         | 16 meses    |
| <b>15</b>             | <b>T19-038</b>         | 5 meses     | <b>35</b>             | <b>T19-240</b>         | 4 meses     |
| <b>16</b>             | <b>T19-039</b>         | 7 meses     | <b>36</b>             | <b>T19-245</b>         | -           |
| <b>17</b>             | <b>T19-042</b>         | 7 días      | <b>37</b>             | <b>T19-249</b>         | 3 meses     |
| <b>18</b>             | <b>T19-043</b>         | 14 días     | <b>38</b>             | <b>T19-257</b>         | 3 meses     |
| <b>19</b>             | <b>T19-070</b>         | 2 meses     |                       |                        |             |
| <b>20</b>             | <b>T19-075</b>         | 1 mes       |                       |                        |             |

“-”: dato desconocido, CEDEB: Centro de Enseñanza y Diagnóstico de Enfermedades en Bovinos.

## **6.2. Estudio *post mortem***

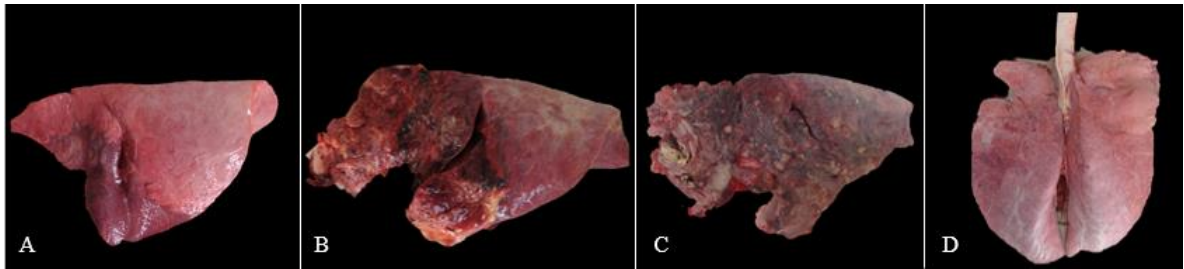
A los 38 bovinos se les realizó el estudio *post mortem* y se colectaron los pulmones, a los cuales se les realizó el diagnóstico morfológico macroscópico con base en la distribución de las lesiones, consistencia y tipo de exudado (Tabla 6), según la clasificación de neumonías propuesta por López y Martinson en el año 2017.

**Tabla 6. Clasificación de neumonías.**

Clasificación de acuerdo con la distribución de las lesiones, la consistencia y el tipo de exudado.

| <b>Clasificación de neumonías</b> | <b>Distribución</b> | <b>Consistencia</b> | <b>Exudado</b> |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|
| <b>Bronconeumonía supurativa</b>  | Craneoventral       | Firme               | Purulento      |
| <b>Bronconeumonía fibrinosa</b>   | Craneoventral       | Firme               | Fibrinoso      |
| <b>Neumonía granulomatosa</b>     | Multifocal          | Firme-dura          | Granulomatoso  |
| <b>Neumonía intersticial</b>      | Generalizada        | Elástica            | -              |

Se observan imágenes representativas de esta clasificación, así como sus características principales (Figura 10).



**Figura 10. Tipos de neumonías según características macroscópicas.**

**A:** Bronconeumonía supurativa, vista lateral izquierda. Lóbulos craneales consolidados y rojos oscuros. **B:** Bronconeumonía fibrinosa, vista lateral izquierda. Distribución craneoventral con exudado fibrinoso. **C:** Neumonía granulomatosa, vista lateral izquierda. Distribución multifocal con exudado granulomatoso. **D:** Neumonía intersticial, vista dorsal. Distribución generalizada; se observan impresiones costales debido a que los pulmones no colapsan.

### 6.3. Estudio histopatológico

Muestras representativas del tejido pulmonar lesionado, se conservaron en formalina al 10% durante 24 horas y fueron procesadas para preparar laminillas las cuales se tiñeron con la tinción de rutina hematoxilina y eosina (H y E). Las laminillas se evaluaron por región anatómica (bronquio, bronquiolo, alvéolo, intersticio y pleura) de acuerdo con la extensión del daño como se describe a continuación:

- Sin lesión
- Leve (1 punto, +): daño al tejido entre el 1% y el 20%; baja cantidad de células inflamatorias ocupando la luz de las vías aéreas, sin pérdida de arquitectura, sin cambios vasculares.
- Moderada (2 puntos, ++): daño al tejido entre 20% y 50%); mayor cantidad de células inflamatorias ocupando la luz de las vías aéreas, cambios vasculares y algunos campos con alteración de la estructura ya sea de bronquios, bronquiolos o alvéolos.

- Grave (3 puntos, +++): daño al tejido mayor al 50%; vías aéreas llenas de células inflamatorias, cambios vasculares evidentes en más del 50% de la sección, áreas de necrosis que conducen a la pérdida de estructura normal.

El diagnóstico morfológico microscópico se basó en las características microscópicas descritas por Caswell y Williams (2016) y por López y Martinson (2017), que toma en cuenta el tipo y distribución del infiltrado inflamatorio (Tabla 7).

**Tabla 7. Clasificación de neumonías de acuerdo con sus características microscópicas**

| <b>Clasificación de neumonías</b> | <b>Características microscópicas</b>  |
|-----------------------------------|---|
| <b>Bronconeumonía supurativa</b>  | Predomina la presencia de neutrófilos degenerados (piocitos) o exudado supurativo en la unión bronquio alveolar.  |
| <b>Bronconeumonía fibrinosa</b>   | Además del infiltrado inflamatorio, predomina la presencia de material eosinofílico acelular y fibrilar (fibrina), así como lesión en los vasos sanguíneos.   |
| <b>Neumonía intersticial</b>      | Las paredes alveolares se aprecian engrosadas debido a la proliferación de neumocitos tipo II. Aumento del número de macrófagos alveolares reactivos; además se puede llegar a observar infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y múltiples zonas de edema. |
| <b>Neumonía granulomatosa</b>     | Está compuesto por macrófagos activados, células gigantes, linfocitos, áreas de necrosis caseosa y puede estar rodeado de una cápsula de tejido conectivo fibroso, formando granulomas.   |

Caswell y Williams 2016; López y Martinson, 2017

#### **6.4. Extracción de ADN**

A partir de los bloques de parafina que contenían las secciones de pulmones con neumonía se obtuvieron de 5 a 8 cortes de 3 micras de grosor, de los cuales se realizó la extracción de ADN empleando el estuche comercial *DNeasy blood & tissue* (Qiagen ®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A cada muestra se le agregaron 1200 µl de xilol, se centrifugaron durante 5 min a 14000 rpm y posteriormente se decantó el xilol. Se agregaron 1200 µl de etanol absoluto, se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm y se decantó el etanol absoluto; este paso se realizó dos veces. La pastilla obtenida se secó durante 1-3 h a 37 °C. Una vez que se secó completamente se le agregaron 180 µl de buffer ATL y 40 µl de proteinasa K, se homogeneizó en el vórtex y se mantuvo a 56 °C durante toda la noche. Al otro día se le agregaron 200 µl de buffer AL y 200 µl de etanol absoluto; se homogeneizó y esta mezcla se transfirió a la columna de purificación que posteriormente fue centrifugada durante 2 min a 8000 rpm. Se desechó el filtrado y la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección. Se le agregaron 500 µl de

buffer AW1, se centrifugó por 1 min a 8000 rpm, se desechó el filtrado y la columna se transfirió a un nuevo tubo de recolección. Se agregaron 500 µl de buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min. Se desechó el filtrado y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min más. Posteriormente la columna se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le agregaron 60 µL de agua para finalmente centrifugar durante 2 min a 14000 rpm. El ADN así extraído se cuantificó en un NanoDrop™ DN-1000 (Thermo Fisher Scientific) y se analizó en el software ND-1000 V3.3.0. Posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

### 6.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN previamente extraído se utilizó para la identificación de los genes específicos de *M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes* mediante PCR, utilizando oligonucleótidos y condiciones de amplificación previamente descritos en la literatura. En la tabla 8 se describe el gen de interés, su función y el tamaño del amplicón. Para el caso de *Mannheimia*, se empleó una PCR múltiple que amplifica 3 genes distintos, *16S*, *lkt* y HP. De acuerdo con los fragmentos que se amplifican, las cepas pueden ser identificadas como *M. haemolytica* (*16S*, *lkt* y HP) o *M. ruminantis* (HP y *16S*) (Alexander *et al.*, 2008). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenía 1x de Master Mix (Thermo Scientific), 1 µM de cada oligonucleótido y 500 ng de ADN. Adicionalmente, en las reacciones de *M. haemolytica* y *H. somni* se agregó 0.5x de solución Q (Qiagen®). Como controles positivos, se utilizó ADN extraído de cepas ATCC de cada una de estas bacterias (excepto *T. pyogenes*).

Todos los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con “SYBR Safe DNA Gel Stain” (Invitrogen®).

**Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.**

| Oligos                        | Secuencia 5´- 3´             | Gen/función                            | pb  | Condiciones                        | Referencia                         |
|-------------------------------|------------------------------|--|-----|------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Mannheimia haemolytica</i> |                              |  |     |                                    |                                    |
| <b>Lkt-F</b>                  | GCAGGAGGTGATTATTA<br>AGTGG   | <i>lkt</i> /<br>Fragmento              | 206 | - Desn.<br>inicial:<br>94 °C/5 min | Alexander,<br><i>et al.</i> , 2008 |
| <b>Lkt-R</b>                  | CAGCAGTTATTGTCATAC<br>CTGAAC | de<br>leucotoxina<br>D                 |     | - 33 ciclos:<br>94 °C/30 s         |                                    |
| <b>16S-F</b>                  | GCTAACTCCGTGCCAGCA<br>G      | <i>16s</i> /<br>16S                    | 304 | 52 °C/20 s<br>72 °C/5 min          |                                    |
| <b>16S-R</b>                  | CGTGGACTACCAGGGTAT<br>CTAATC | ribosomal<br>(bacterias en<br>general) |     | - Ext. final:<br>72 °C/5 min       |                                    |
| <b>HP-F</b>                   | CGAGCAAGCACAATTAC<br>ATTATGG | Proteína<br>hipotética                 | 90  |                                    |                                    |
| <b>HP-R</b>                   | CACCGTCAAATTCCTGTG<br>GATAAC |  |     |                                    |                                    |



| <i>Pasteurella multocida</i> |                            |                                     |     |  |                               |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----|--|-------------------------------|
| <b>Pm1231-F</b>              | AGAAAGCACATGACCAA<br>AGG   | <i>pm0762/</i><br>Regulador         | 567 | - Desn.<br>inicial:<br>94 °C/2 min   | Liu <i>et al.</i> ,<br>2004   |
| <b>Pm1231-R</b>              | GCAGCTACTCGCAGAAG<br>GTT   | transcripcion<br>al                 |     | - 30 ciclos:<br>94 °C/20 s<br>55 °C/20 s<br>72 °C/45 s<br>- Ext. final:<br>72 °C/2 min     |                               |
| <i>Histophilus somni</i>     |                            |                                     |     |  |                               |
| <b>16SHsom-F</b>             | GAAGGCGATTAGTTTAAG<br>AG   | <i>16s/</i><br><i>16S</i>           | 313 | - Desn.<br>inicial: 94<br>°C/3 min   | Saunders <i>et al.</i> , 2007 |
| <b>16SHsom-R</b>             | ACTCGAGCGTCAGTATCT<br>TC   | ribosomal<br><i>H. somni</i>        |     | - 30 ciclos:<br>94 °C/1 min<br>55 °C/1 min<br>72 °C/1 min<br>- Ext. final:<br>72 °C/10 min |                               |
| <i>Mycoplasma bovis</i>      |                            |                                     |     |  |                               |
| <b>Mycobov-F</b>             | GTTTGATCCTGGCTCAGG<br>AT   | <i>16s/</i><br><i>16S</i>           | 198 | - Desn.<br>inicial: 95<br>°C/15 min  | Tramuta <i>et al.</i> , 2011  |
| <b>Mycobov-R</b>             | CAAACGCTTCCTTTTATA<br>TTAC | ribosomal <i>M.</i><br><i>bovis</i> |     | - 40 ciclos:<br>94 °C/1 min<br>52 °C/1 min<br>72 °C/1 min<br>- Ext. final:<br>72 °C/10 min |                               |
| <i>Trueperella pyogenes</i>  |                            |                                     |     |  |                               |
| <b>Plo-F</b>                 | TCATCAACAATCCCACGA<br>AGAG | <i>plo/piolisina</i>                | 150 | - Desn.<br>inicial: 94<br>°C/5 min   | Silva <i>et al.</i> ,<br>2008 |
| <b>Plo-R</b>                 | TTGCCTCCAGTTGACGCT<br>TT   |                                     |     |  |                               |

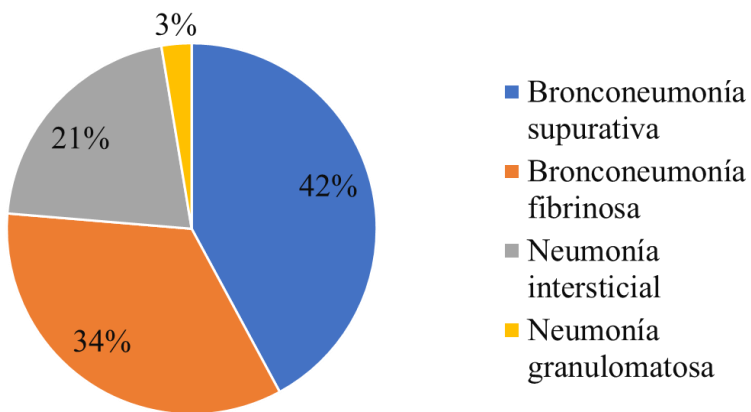
Desn. inicial: desnaturalización inicial; Ext. final: extensión final.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Descripción de las lesiones macroscópicas (diagnóstico morfológico macroscópico)

Después de realizar el estudio *post mortem*, se extrajeron y examinaron los pulmones de los 38 bovinos y se realizó el diagnóstico morfológico macroscópico tomando en cuenta la distribución, consistencia y tipo de exudado (Tabla 9 y Figura 10).

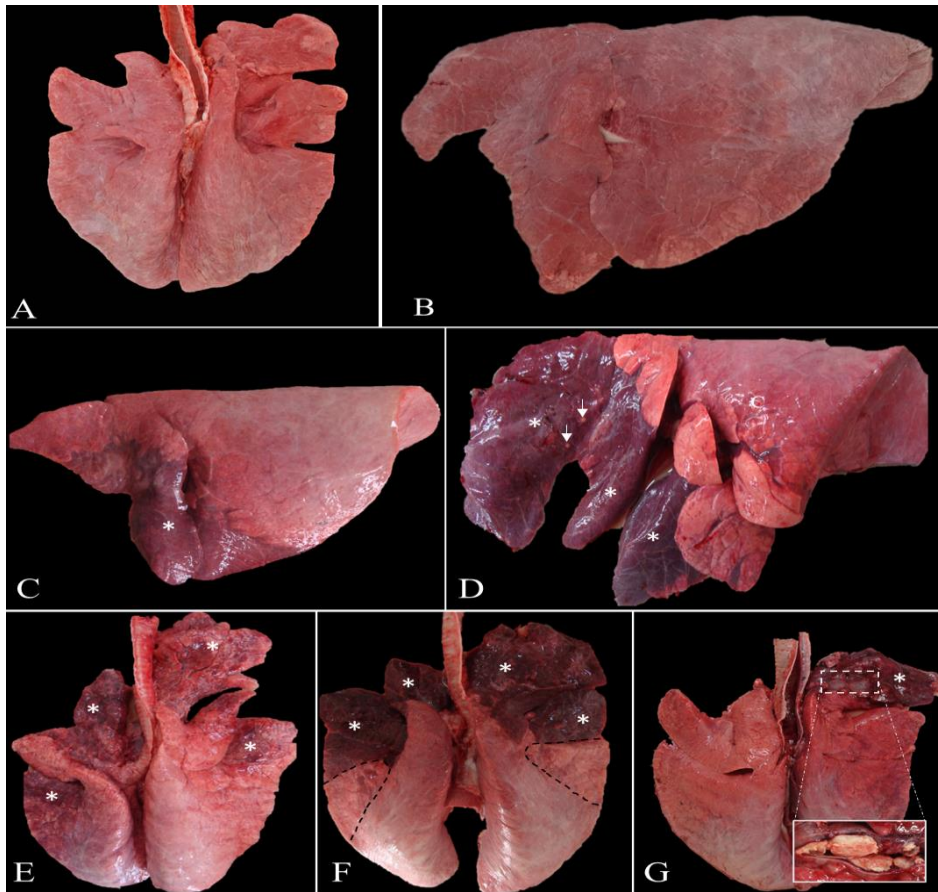
De los 38 casos evaluados, el 42% presentó bronconeumonía supurativa (16 casos), el 34% bronconeumonía fibrinosa (13 casos), el 21% neumonía intersticial (8 casos) y el 3 % neumonía granulomatosa a 1 caso, respectivamente (Figura 11).



**Figura 11. Diagnósticos morfológicos macroscópicos de los pulmones evaluados.**

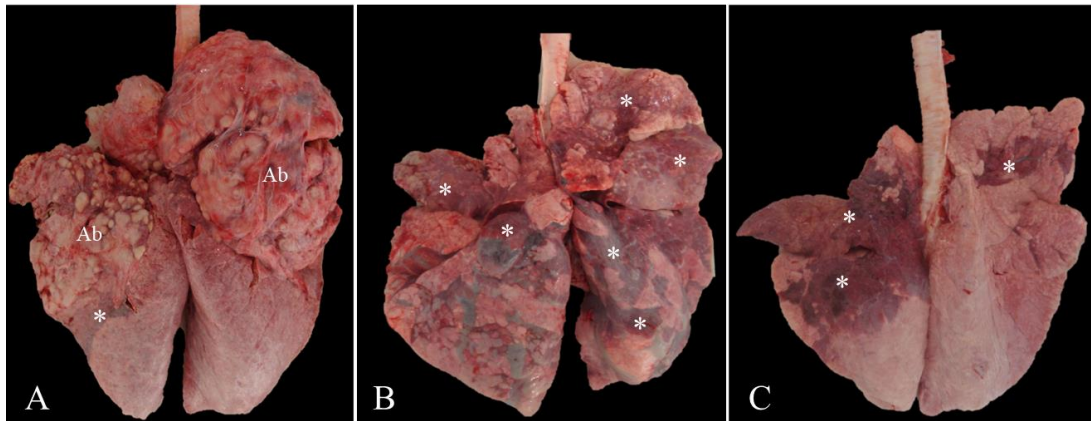
#### 7.1.1. Bronconeumonía supurativa

De los 38 casos, 16 (42%) corresponden a bronconeumonía supurativa. En cuanto a la distribución de las lesiones, la mayoría de los casos presentó lesiones bien delimitadas en los lóbulos craneales; sin embargo en algunos casos, debido al alto grado de lobulación de los bovinos, se apreciaron lesiones irregulares con aspecto de tablero de ajedrez por la mezcla de lóbulos sanos y consolidados. El término consolidación se utiliza en el examen macroscópico cuando la textura del pulmón neumónico se vuelve más firme como resultado de la pérdida de espacios aéreos debido al exudado y atelectasia (Figura 12 y Figura 13). Las lesiones presentes en estos casos fueron clásicas de bronconeumonía supurativa: exudado supurativo en la superficie de corte, abscesos y congestión del resto del parénquima pulmonar; en 7 casos además se observó bronquiectasia.



**Figura 12. Lesiones asociadas con bronconeumonía supurativa.**

**A y B:** fotografía de la vista dorsal (A) y lateral (B) de pulmones sanos de bovino (en la A se aprecia también una porción de la tráquea con la luz expuesta). **C:** caso 1, vista lateral. Presentación clásica de la bronconeumonía supurativa. La porción craneoventral de los lóbulos afectados es roja oscura (asterisco) y moderadamente firme. **D:** caso 3, vista lateral. Consolidación de los lóbulos craneales e intermedios (asteriscos); sobre relieve se aprecian lesiones amarillas circulares compatibles con exudado purulento (flechas). Se observa la ligera congestión de los lóbulos caudales. **E:** caso 4, vista dorsal. La consolidación en los lóbulos es zonalmente extensiva (asteriscos); se observa afectado más del 50% del parénquima pulmonar. **F:** caso 8, vista dorsal. Lóbulos craneales consolidados (asteriscos). La región lateral de los lóbulos caudales, delimitada con líneas punteadas, se aprecia irregular y con aspecto de tablero de ajedrez, el cual corresponde a la mezcla de lobulillos sanos y lobulillos consolidados. **G:** caso 9, vista dorsal. Bronconeumonía supurativa crónica; el lóbulo craneal derecho está consolidado (asterisco). Sobre relieve se observan áreas amarillas multifocales bien delimitadas que al corte contienen exudado purulento (acercamiento). Es evidente el material amarillo que ocupa y dilata los espacios aéreos generando bronquiectasia.

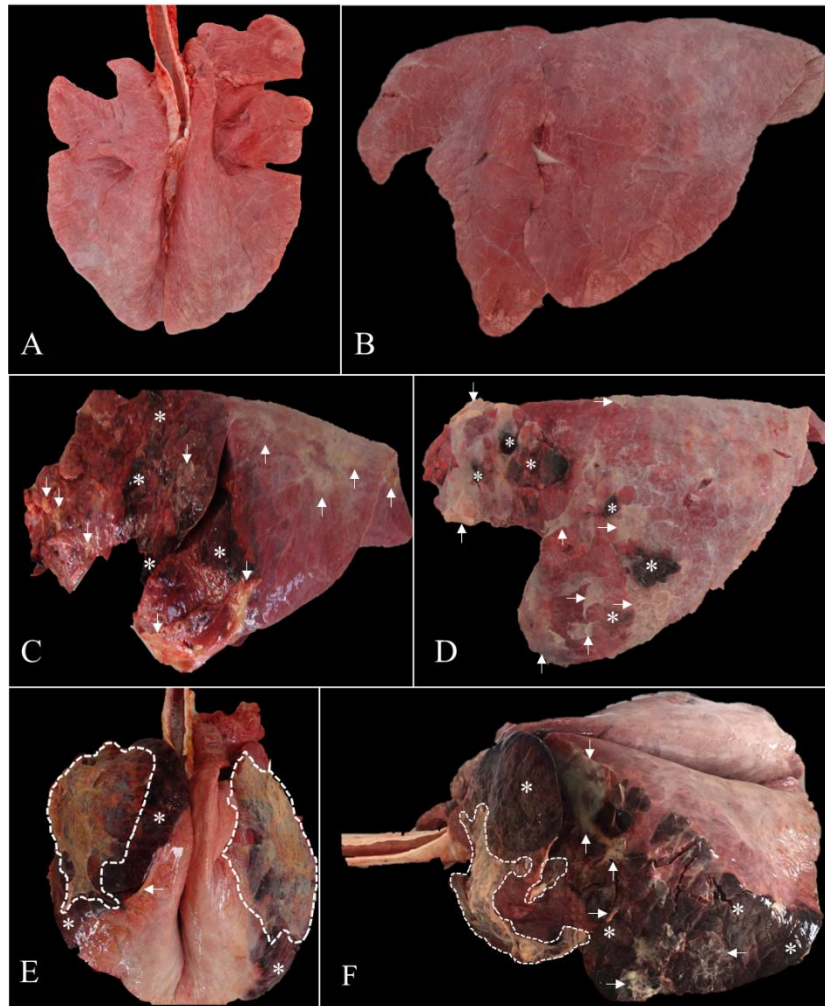


**Figura 13. Lesiones asociadas con bronconeumonía supurativa.**

**A:** caso 11, vista dorsal. Bronconeumonía supurativa crónica grave. Se observa la presencia de abundantes abscesos (Ab) deformando los lóbulos craneales derechos e izquierdos, así como los lóbulos medios. Se observan algunas áreas consolidadas (asterisco). **B:** caso 26, vista dorsal. Consolidación multifocal en todos los lóbulos pulmonares (asteriscos), generando un patrón de daño zonalmente extensivo. La lesión de tablero de ajedrez irregular es más evidente en ambos lóbulos caudales. **C:** caso 28, vista dorsal. Consolidación de los lóbulos craneales izquierdos (asterisco), con algunos lobulillos sanos (no consolidados) entremezclados. La lesión se extiende hasta la porción media del lóbulo caudal. En la parte central del lóbulo craneal derecho hay áreas rojas oscuras que corresponden a áreas de consolidación (asterisco) y que contrastan con el resto de los lóbulos aparentemente sanos.

### **7.1.2. Bronconeumonía fibrinosa**

Trece de los casos (34%) presentaron bronconeumonía fibrinosa. En estos se observó consolidación de los lóbulos craneales, depósito multifocal (y en algunas ocasiones en placa) de exudado fibrinoso, así como múltiples áreas de congestión. En los trece casos el depósito de fibrina afectó a más del 50% de la superficie pleural. Los pulmones estaban aumentados de tamaño y era difícil distinguir la separación de los lóbulos craneales de los medios debido a la inflamación y a las hemorragias (Figura 14).



**Figura 14. Lesiones asociadas con bronconeumonía fibrinosa.**

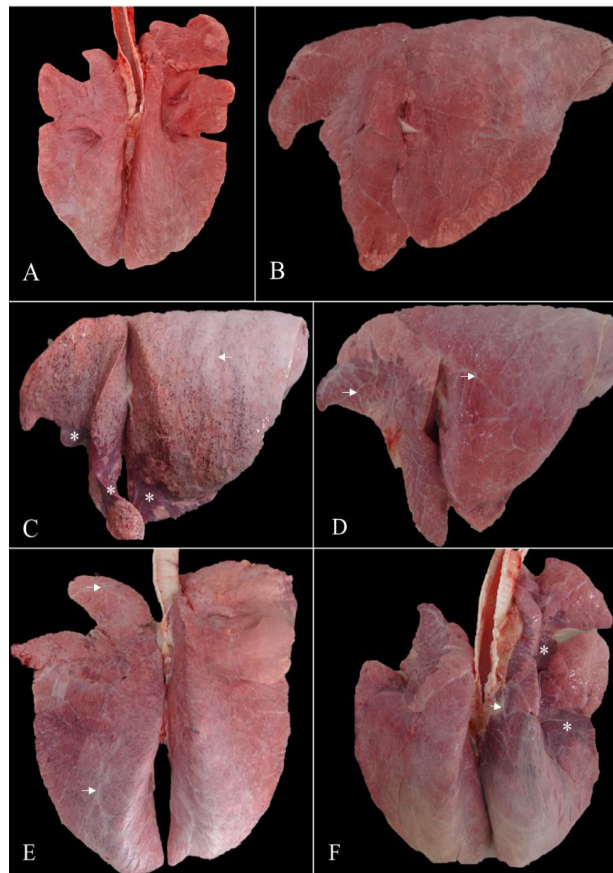
**A y B:** pulmones sanos de bovino; vista dorsal con un fragmento de tráquea cuya luz está expuesta (A) y vista lateral (B). **C:** caso 10, vista lateral. Se observa la superficie totalmente afectada, color rojo intenso, con áreas de hemorragia (asteriscos) y exudado amarillo brillante que se deposita sobre la superficie de los lóbulos craneales y caudales (flechas), resultando en un patrón de distribución multifocal. El pulmón se encuentra hinchado y con consistencia firme. **D:** caso 22, vista lateral. Aproximadamente el 90% de la superficie pleural está cubierto con exudado blanco amarillento (flechas) distribuido de manera zonalmente extensiva; también se observan áreas multifocales de hemorragias (asteriscos). El daño se extiende hasta los lóbulos caudales. **E:** caso 15, vista dorsal. Se observan áreas de hemorragias en los lóbulos craneales, medios y una porción de los lóbulos caudales (asteriscos). Las líneas punteadas delimitan el depósito de fibrina (placas de fibrina) sobre una porción de las hemorragias. Además, se observa depósito de fibrina alejado del depósito en placa (flecha). El pulmón se observa redondeado y no se aprecian con claridad los lóbulos craneales y medios debido al proceso inflamatorio severo que afecta el parénquima. **F:** caso 23, vista dorsolateral. El pulmón se observa hiperinflado y deformado de los bordes laterales de los lóbulos medios, así como de los lóbulos caudales; se observa una zona de hemorragia grave que afecta los lóbulos craneales, medios y todo el borde lateral del lóbulo caudal (asteriscos). Se observa depósito



de exudado fibrinoso en placa en lóbulos craneales y medios (líneas punteadas), además de múltiples zonas de depósito de este exudado (flechas).

### 7.1.3. Neumonía intersticial

En esta categoría se encontraron 8 casos (21%); la característica predominante fue que los pulmones no colapsaron, todos tenían aspecto carnoso y no presentaban exudado. Los septos interlobulillares se observaban prominentes generando un aspecto jaspeado. En algunos casos se observó consolidación en algunos lobulillos y hemorragias; además, en uno de los casos se encontraron impresiones costales. Las impresiones costales y los pulmones no colapsados indican que probablemente el daño se debe a un proceso viral, pero los hallazgos de consolidación y las hemorragias indican que puede haber agentes bacterianos complicando el proceso inflamatorio (Figura 15).



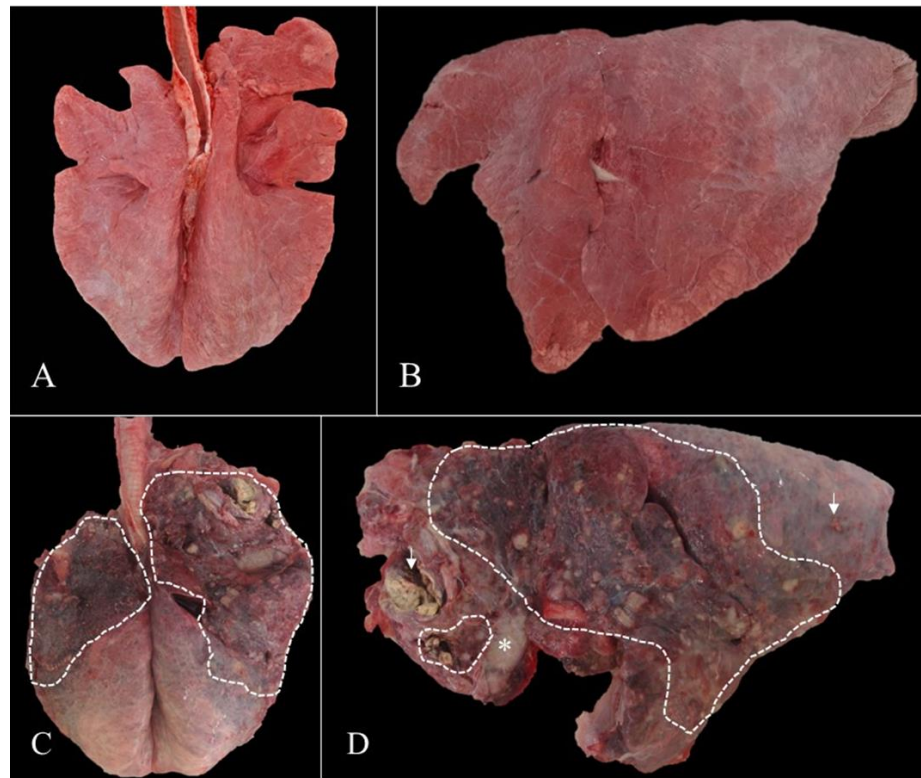
**Figura 15. Lesiones asociadas con neumonía intersticial.**

**A y B:** pulmones sanos de bovino; vista dorsal con una porción de la tráquea con la luz expuesta (A) y vista lateral (B). **C:** caso 2, vista lateral. Se observa el parénquima pulmonar totalmente afectado, pálido, no se encuentra colapsado y se aprecian impresiones costales (flecha). De manera multifocal se aprecian petequias sobre la superficie pulmonar, así como

múltiples áreas de consolidación en los lóbulos craneales y medios (asterisco). **D:** caso 16 vista lateral. Se observa el parénquima pulmonar con hiperinflación, ligeramente pálido y septos interlobulillares evidentes (flechas). **E:** caso 7, vista dorsal. Se aprecia el pulmón no colapsado y los lóbulos craneales derechos con aspecto carnososo. Los septos interlobulillares son prominentes y mayormente observables en el pulmón izquierdo (flechas). **F:** caso 16, vista dorsal. Pulmón no colapsado, ligeramente pálido. Hay consolidación multifocal en el pulmón izquierdo (asterisco); los septos interlobulillares se encuentran engrosados (flecha).

#### 7.1.4. Neumonía granulomatosa

Únicamente 1 caso fue diagnosticado macroscópicamente como neumonía granulomatosa (3%). En este se observó el 90% del parénquima pulmonar congestionado, los lóbulos consolidados y múltiples nódulos blancos amarillentos bien delimitados, de consistencia firme (granulomas), distribuidos a lo largo del parénquima pulmonar. Además también se encontró una zona de depósito de fibrina (Figura 16).



**Figura 16. Lesiones asociadas con neumonía granulomatosa.**

**A y B:** pulmones sanos de bovino; vista dorsal con una porción de la tráquea con la luz expuesta (A) y vista lateral (B). **C:** caso 33, vista dorsal. El área punteada delimita las zonas afectadas del pulmón en las que se observa el color rojo oscuro y numerosas estructuras color amarillo a sobre relieve dispuestas sobre esta área. **D:** caso 33, vista lateral. Se observan múltiples estructuras

(granulomas) a sobre relieve de color amarillo oscuro distribuidas en lóbulos craneales, medios y caudales (flechas); también se observa una zona en la que se depositó fibrina (asterisco).

Aunque todos los casos se clasificaron de acuerdo con las lesiones que predominaban, 16 de los 38 presentaban varios elementos que generaban patrones de daño mixtos. Debido a lo anterior, no todas las lesiones encontradas en las neumonías supurativas se limitaban a la porción craneoventral del pulmón, sino que había casos en los que la distribución era zonalmente extensiva (Figura 13B). También se observó que los casos 8 y 9 tenían características tanto de bronconeumonía supurativa como intersticial (Figura 12F y G), ya que se aprecian los lóbulos caudales hinchados y de aspecto gomoso. Estas características sugieren que coexiste un proceso inflamatorio intersticial. Así mismo, en el caso 23 de bronconeumonía fibrinosa, se observó el parénquima pulmonar hiperinflado, de aspecto gomoso, también sugerente de neumonía intersticial (Figura 14F).

Por otro lado, el caso 2 se clasificó como neumonía intersticial debido a que los pulmones no colapsaron, tenían apariencia gomosa y ausencia de exudado visible (Figura 15C), sin embargo, se pueden observar petequias a lo largo de la superficie pulmonar, lo que es sugerente de que existe un proceso hemorrágico concomitante, pero también se aprecia la consolidación de los lóbulos craneales, sugerente de un proceso neumónico de tipo supurativo. Tomando en cuenta todo lo anterior, se describe el diagnóstico morfológico integral para cada caso (Tabla 9).

**Tabla 9. Diagnósticos morfológicos macroscópicos.**

| <b>Número de caso</b> | <b>Diagnóstico morfológico macroscópico</b>   |
|-----------------------|---|
| <b>1</b>              | Bronconeumonía fibrinosupurativa moderada zonal.  |
| <b>2</b>              | Bronconeumonía supurativa multifocal coalescente moderada y neumonía intersticial generalizada grave con petequias. |
| <b>3</b>              | Bronconeumonía supurativa grave zonal.  |
| <b>4</b>              | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva.   |
| <b>5</b>              | Bronconeumonía supurativa grave multifocal coalescente.   |
| <b>6</b>              | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva.   |
| <b>7</b>              | Neumonía intersticial grave generalizada.   |
| <b>8</b>              | Bronconeumonía supurativa grave zonal con granulomas multifocales.  |
| <b>9</b>              | Bronconeumonía supurativa grave zonal con nódulos caseonecróticos.  |
| <b>10</b>             | Bronconeumonía fibrinonecrótica grave zonalmente extensiva y pleuritis fibrinosa grave zonal.                       |
| <b>11</b>             | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva con nódulos caseonecróticos multifocales coalescentes.         |
| <b>12</b>             | Bronconeumonía supurativa moderada zonal.   |



|    |  |
|----|--|
| 13 | Bronconeumonía fibrinosupurativa moderada zonalmente extensiva.  |
| 14 | Bronconeumonía fibrinohemorrágica y necrótica grave generalizada.  |
| 15 | Bronconeumonía fibrinohemorrágica y necrótica grave zonalmente extensiva.  |
| 16 | Neumonía intersticial grave generalizada y bronconeumonía supurativa moderada zonal.                                 |
| 17 | Bronconeumonía supurativa grave zonal.   |
| 18 | Bronconeumonía fibrinosupurativa grave unilateral derecha.   |
| 19 | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva.  |
| 20 | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva con hemorragias graves zonales.                                 |
| 21 | Bronconeumonía fibrinosa zonalmente extensiva.   |
| 22 | Bronconeumonía fibrinosa y necrótica grave generalizada.   |
| 23 | Bronconeumonía fibrinonecrótica grave zonal.   |
| 24 | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva con abscesos multifocales.                                      |
| 25 | Bronconeumonía fibrinosa y necrótica grave zonalmente extensiva.   |
| 26 | Bronconeumonía supurativa grave generalizada con granulomas multifocales.  |
| 27 | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva con nódulos caseonecróticos.                                    |
| 28 | Bronconeumonía supurativa moderada zonalmente extensiva.   |
| 29 | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva.  |
| 30 | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva.  |
| 31 | Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva con nódulos caseonecróticos multifocales.                       |
| 32 | Bronconeumonía supurativa grave unilateral derecha.  |
| 33 | Neumonía granulomatosa grave multifocal.   |
| 34 | Neumonía intersticial moderada zonal.  |
| 35 | Bronconeumonía fibrinosa moderada zonalmente extensiva.  |
| 36 | Bronconeumonía fibrinosa grave zonalmente extensiva con múltiples nódulos caseonecróticos multifocales coalescentes. |
| 37 | Bronconeumonía supurativa grave zonal con abscesos multifocales.   |
| 38 | Bronconeumonía fibrinosa grave zonalmente extensiva.   |

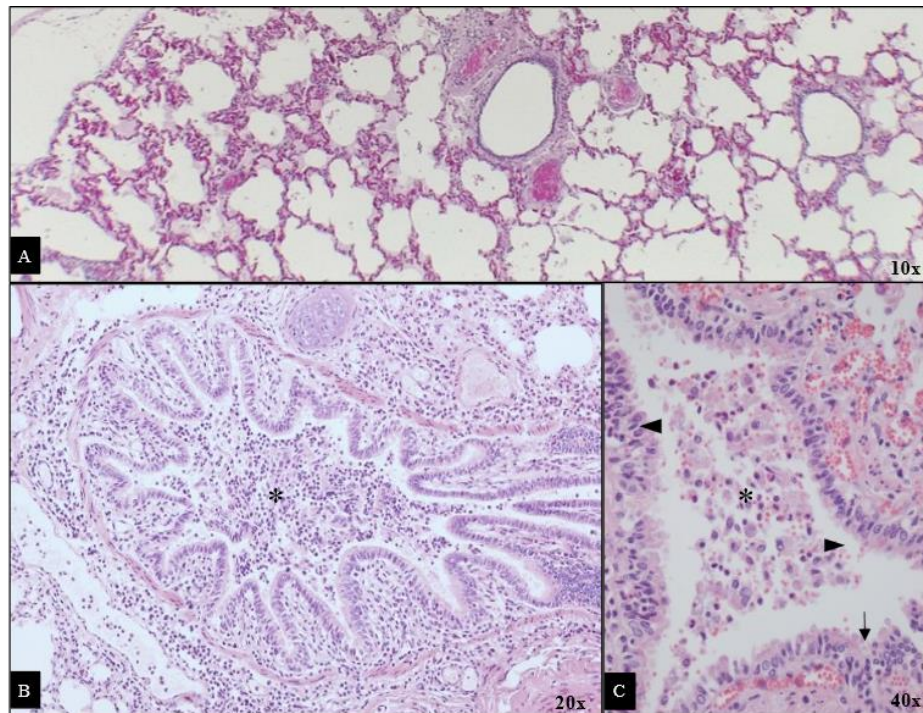
## **7.2. Descripción de las lesiones microscópicas (diagnóstico morfológico microscópico)**

Después de la evaluación macroscópica de los casos, las secciones pulmonares colectadas fueron procesadas y teñidas con H y E para su análisis histopatológico. El diagnóstico morfológico microscópico se basó en lo descrito por Caswell y Williams (2016) y López y Martinson (2017) (Tabla 7).

### 7.2.1. Bronconeumonía supurativa

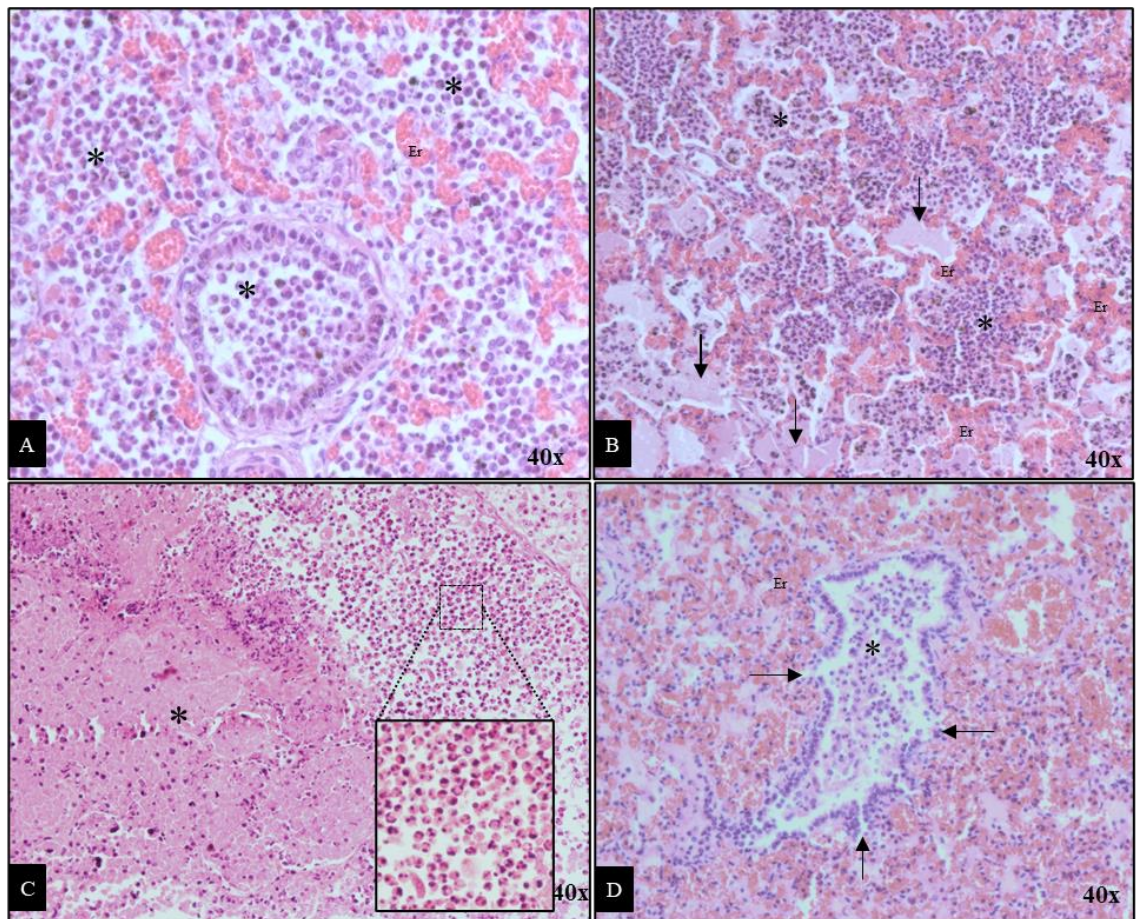
El hallazgo microscópico predominante fue el infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos, piocitos y macrófagos espumosos ocupando alvéolos bronquios y bronquiolos. También se observó bronquiolitis, bronquitis, ciliostasis, edema, congestión, hemorragias y necrosis (Figura 17 y Figura 18).

Las hemorragias, edema, pérdida de la arquitectura pulmonar se pueden deber a los microorganismos involucrados, así como a la cronicidad del proceso inflamatorio.



**Figura 17. Hallazgos microscópicos observados en la bronconeumonía supurativa.**

**A:** Fotomicrografía de pulmones sanos. **B:** caso 9. Se observa que la luz del bronquio está ocupada por infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos, piocitos y algunos macrófagos espumosos (asterisco). **C:** caso 9. La luz del bronquiolos se encuentra ocupada por infiltrado inflamatorio (asterisco). Se observa la pérdida de la continuidad del epitelio bronquial (flecha) además de la ciliostasis en toda la sección de este corte (puntas de flecha).



**Figura 18. Hallazgos microscópicos observados en la bronconeumonía supurativa.**

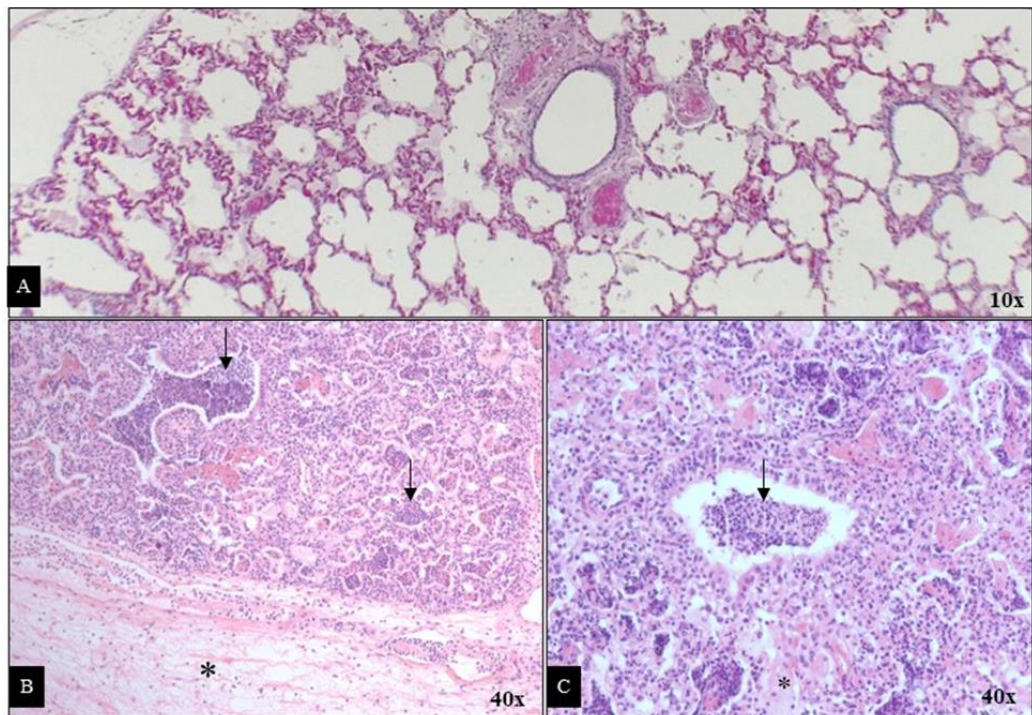
**A:** caso 4. Infiltrado inflamatorio polimorfonuclear ocupando la luz del bronquiolo y de los alvéolos circundantes (asteriscos). Se observa marcada pérdida de la arquitectura alveolar debido al infiltrado inflamatorio. Se observan múltiples zonas de extravasación de eritrocitos (Er) que corresponden a zonas de hemorragia. **B:** caso 5. Las paredes alveolares se observan engrosadas y rodeadas por eritrocitos (Er); dentro de algunos alvéolos se aprecia la presencia de material anfófilo que corresponde a edema (flechas). Se aprecia que varios alvéolos se encuentran infiltrados con piocitos (asteriscos). **C:** caso 9. Al centro y a la izquierda de la fotomicrografía, se aprecia pérdida de la arquitectura del tejido, el cual es reemplazado por restos celulares correspondiente con necrosis (asterisco). Rodeando el área de necrosis se encuentra infiltrado inflamatorio compuesto por piocitos (acercamiento). **D:** caso 20. Destaca la pérdida de la continuidad del epitelio del bronquiolo (flechas), el cual se encuentra infiltrado por piocitos (asterisco). Los alvéolos que rodean el bronquiolo se encuentran engrosados y rodeados por abundantes eritrocitos extravasados (hemorragias).



### 7.2.2. Bronconeumonía fibrinosa

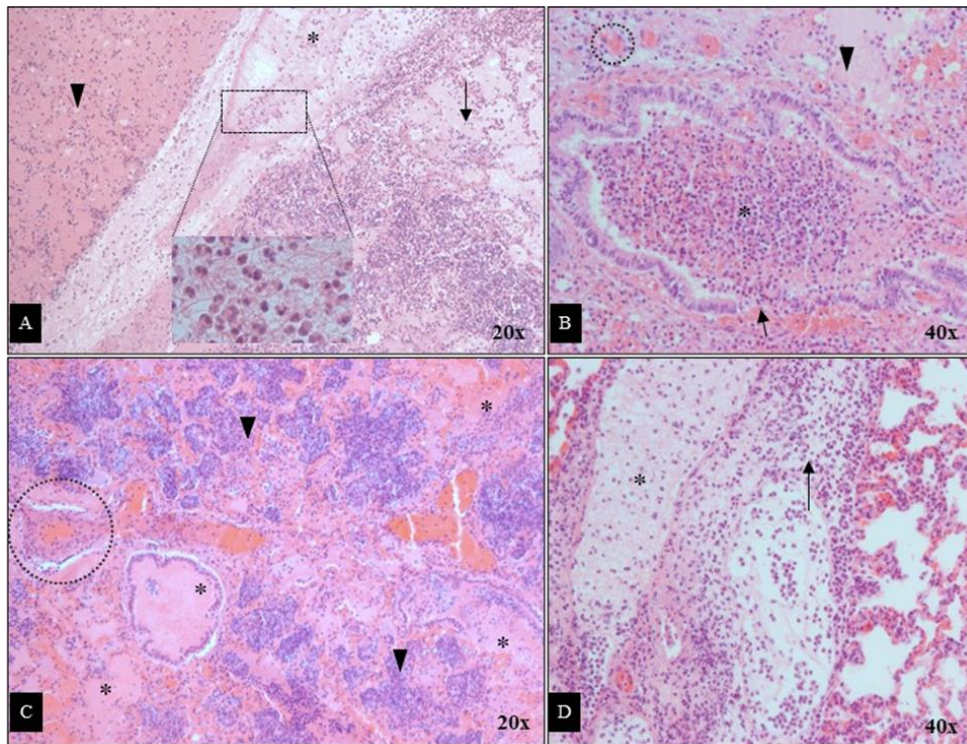
Los hallazgos microscópicos que se encontraron en estos casos fueron el depósito de fibrina, hemorragias, infiltrado inflamatorio polimorfonuclear y mononuclear, edema y necrosis segmentaria del epitelio bronquial (Figura 19 y Figura 20).

Estos hallazgos son similares a los descritos en la bronconeumonía supurativa, pero se agrega a las descripciones la fibrina, elemento encontrado después de un daño vascular. El daño vascular es comúnmente causado por factores de virulencia de algunos patógenos como *M. haemolytica* o *H. somni* y por la respuesta inflamatoria exacerbada del hospedero. En general, se trata de un evento inflamatorio más grave o de mayor cronicidad.



**Figura 19. Hallazgos microscópicos observados en la bronconeumonía fibrinosa.**

**A:** fotomicrografía de pulmones sanos. **B:** caso 14. Material eosinofílico fibrilar correspondiente con fibrina, la cual infiltra el septo interlobulillar; este infiltrado fibrilar está entremezclado con picocitos (asterisco). Los espacios alveolares están infiltrados por picocitos y por macrófagos espumosos (flecha). **C:** caso 15. De manera generalizada se observa la pérdida de la arquitectura normal de los tabiques alveolares, los cuales son reemplazados por fibrina condensada (asterisco), infiltrado inflamatorio (flecha), y restos celulares. Se observa necrosis segmentaria del epitelio de bronquios y bronquiolos, ciliostasis e infiltrado inflamatorio ocupando la luz de los espacios aéreos.



**Figura 20. Hallazgos microscópicos observados en la bronconeumonía fibrinosa.**

**A:** caso 15. Tabique interlobulillar expandido por depósito de material fibrilar eosinofílico que corresponde a fibrina (rectángulo). En el aumento de esta sección se observa el material fibrilar entremezclado con piocitos. Se aprecia una área hipereosinofílica con pérdida del detalle celular la cual corresponde a restos celulares entremezclados con edema y fibrina (punta de flecha). Se observa la pérdida de continuidad de las paredes alveolares. En el interior de los alvéolos se observa material ligeramente eosinofílico que corresponde a edema. Por debajo de esa sección se aprecia a los alvéolos llenos de infiltrado inflamatorio. **B:** caso 22. Al centro de la imagen se observa un bronquiolo infiltrado por piocitos, macrófagos espumosos, restos celulares, edema y fibrina (asterisco). La flecha señala una de las zonas de necrosis segmentaria del epitelio. Superior al bronquiolo se observan espacios eosinofílicos que corresponden a edema (punta de flecha); también se observan eritrocitos y fibrina. Los capilares y vasos sanguíneos de mediano calibre se encuentran severamente congestionados (círculo punteado) **C:** caso 23. Sección de pulmón gravemente afectada por infiltrado inflamatorio y cambios vasculares. Pérdida de la arquitectura del epitelio respiratorio; el epitelio alveolar está exfoliado, necrótico y se deposita en la luz alveolar entremezclado con infiltrado inflamatorio mixto (puntas de flecha). Rodeando estos alvéolos se aprecia material eosinofílico que corresponde con edema, eritrocitos y restos celulares. El bronquiolo está infiltrado con fibrina, edema, eritrocitos y algunos neutrófilos, las áreas circundantes también presentan estas características más el infiltrado inflamatorio mixto (asterisco). También se observa congestión en vasos sanguíneos (círculo punteado) **D:** caso 23. Espacio interlobulillar expandido por edema entremezclado con piocitos (asterisco). Se observa infiltrado inflamatorio mixto (flecha), así como eritrocitos extravasados.

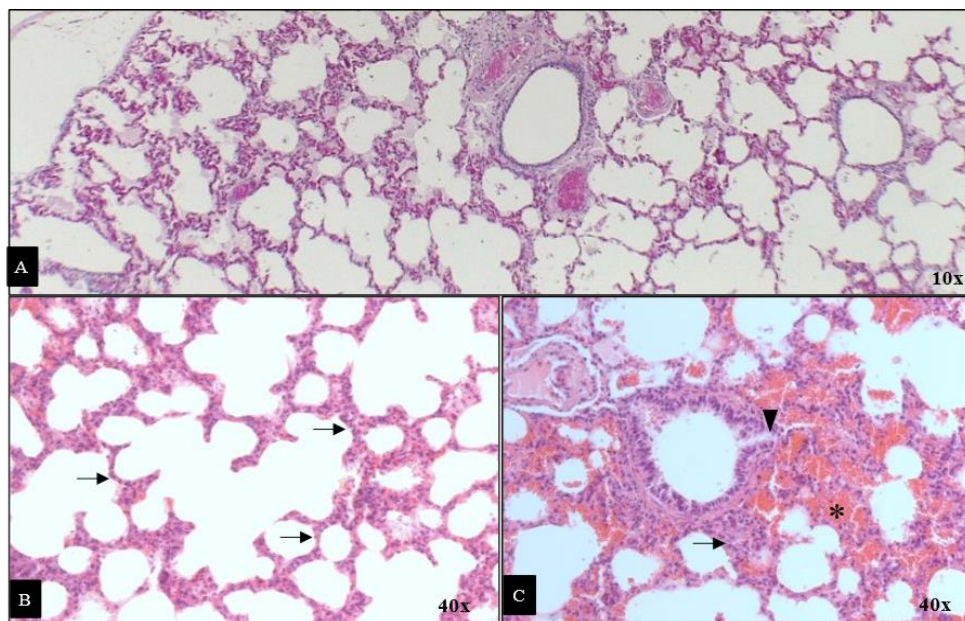


### 7.2.3. Neumonía intersticial

En los casos diagnosticados como neumonía intersticial se observó daño alveolar generalizado, que incluye edema, formación de membranas hialinas, hemorragias, y proliferación de neumocitos tipo II (Figura 21 y Figura 22).

Los diferentes hallazgos microscópicos de este tipo de neumonía se podrían explicar con base en las diferentes fases de este proceso inflamatorio. En la neumonía intersticial aguda el daño al endotelio de los capilares alveolares o a los neumocitos tipo I provoca rotura de la barrera hematoaérea, lo que a su vez genera exudación de proteínas plasmáticas hacia el espacio alveolar; esto constituye la fase exudativa. Las membranas hialinas observadas en esta fase se deben a la mezcla de este fluido proteináceo con lípidos y otros componentes del surfactante; estas membranas se adhieren a las membranas basales alveolares y a las paredes bronquiales (Figura 22A). La acumulación de edema y neutrófilos en el intersticio alveolar genera engrosamiento de las paredes alveolares. Después de esta fase aguda exudativa se presenta la fase proliferativa, caracterizada por la hiperplasia de los neumocitos tipo II que reemplazan a los neumocitos tipo I dañados, lo que se conoce como epitelización alveolar y constituye la fase proliferativa. Como consecuencia las paredes alveolares se observan aún más engrosadas (Figura 22B).

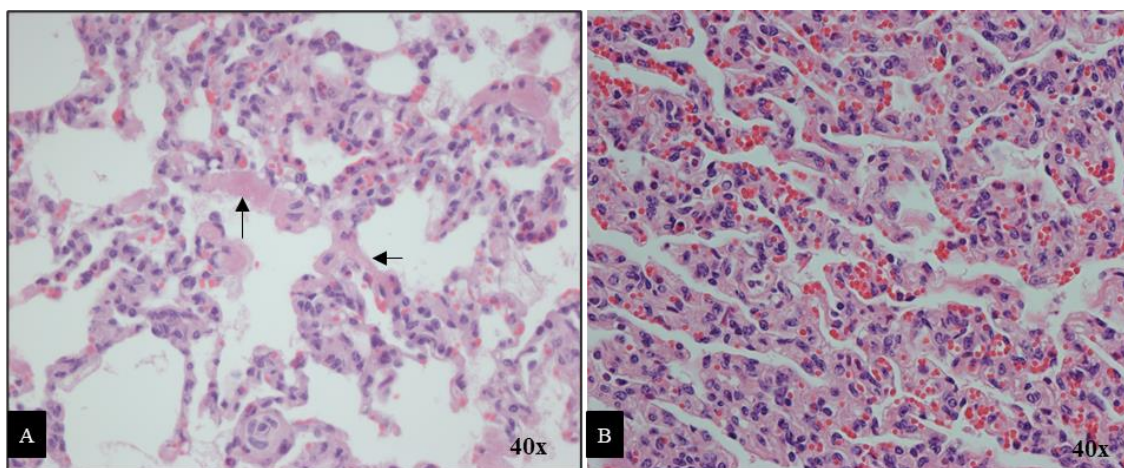
Cuando el daño alveolar persiste, las lesiones de las fases exudativa y proliferativa de la neumonía intersticial aguda pueden progresar hacia neumonía intersticial crónica, caracterizada por la fibrosis de las paredes alveolares, así como por la presencia de linfocitos, macrófagos, fibroblastos y miofibroblastos en el intersticio alveolar.



**Figura 21. Hallazgos microscópicos observados en la neumonía intersticial.**

**A:** histología de pulmones sanos. **B:** caso 2 Se resaltan las paredes alveolares engrosadas (flechas) generalizadamente. **C:** caso 2. Daño grave generalizado en las paredes alveolares; se

observa material hipereosinofílico que corresponde a eritrocitos extravasados (asterisco). Necrosis segmentaria del epitelio bronquiolar (punta de flecha), zonas eosinofílicas claras correspondientes con edema y engrosamiento de las paredes alveolares (flecha).



**Figura 22. Hallazgos microscópicos observados en la neumonía intersticial.**

**A:** caso 7. Engrosamiento de las paredes alveolares con extravasación de eritrocitos. Se observan membranas hialinas cubriendo el interior de las paredes alveolares (flechas). **B:** caso 16. Las paredes alveolares están gravemente aumentadas de tamaño debido a la hiperplasia de los neumocitos tipo II.

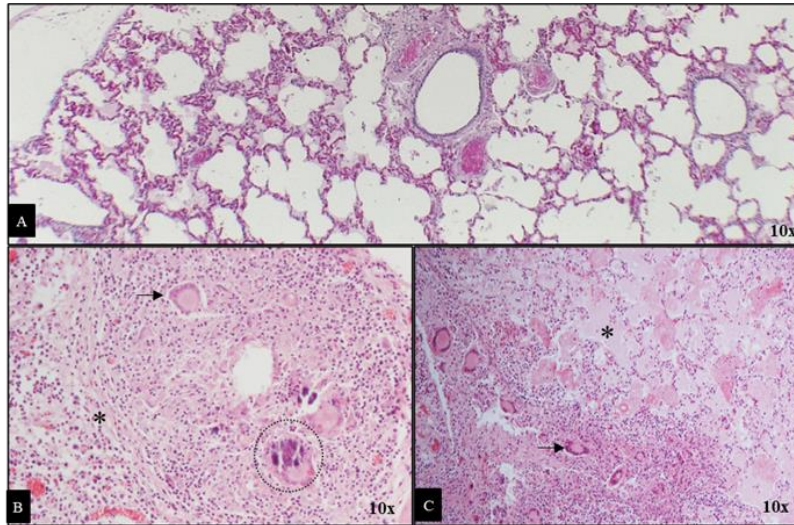
#### **7.2.4. Neumonía granulomatosa**

En 5 de los casos se encontró la formación de granulomas, por lo que se les dio el diagnóstico morfológico microscópico de neumonía granulomatosa. Los hallazgos microscópicos que se encontraron fueron pérdida de la arquitectura del epitelio respiratorio, reacción inflamatoria granulomatosa, formación de granulomas, edema, congestión, zonas de mineralización y presencia de células gigantes tipo Langhans (Figura 23 y Figura 24).

La reacción inflamatoria granulomatosa normalmente se asocia con bacterias, aunque también pueden estar involucrados otros microorganismos o cuerpos extraños. Algunos de los casos presentaron zonas de mineralización (Figura 23B y 24A y B), aunque no todos presentaron centro necrótico (Figura 23C) y no todos tenían la cápsula de tejido conectivo fibroso (Figura 24A). Estas características se pueden deber a la cronicidad del evento inflamatorio, a los agentes involucrados y a la respuesta inmune de cada individuo.

Las células gigantes tipo Langhans se asocian a agentes que no se pudieron fagocitar (antígenos persistentes) por lo que su presencia podría indicar que el estímulo es crónico. Este hallazgo se observó en todos los casos que presentaron inflamación de tipo granulomatosa. La presencia y cantidad de restos celulares (necrosis) se debe a una respuesta inflamatoria exacerbada y una falla en un intento de controlar el estímulo inflamatorio. No todos los casos que presentaron formación de granulomas tenían centro necrótico, lo que puede indicar que probablemente el evento estaba en estadios iniciales o que la respuesta inflamatoria estaba controlando el estímulo. Por otro lado, la presencia de tejido conectivo

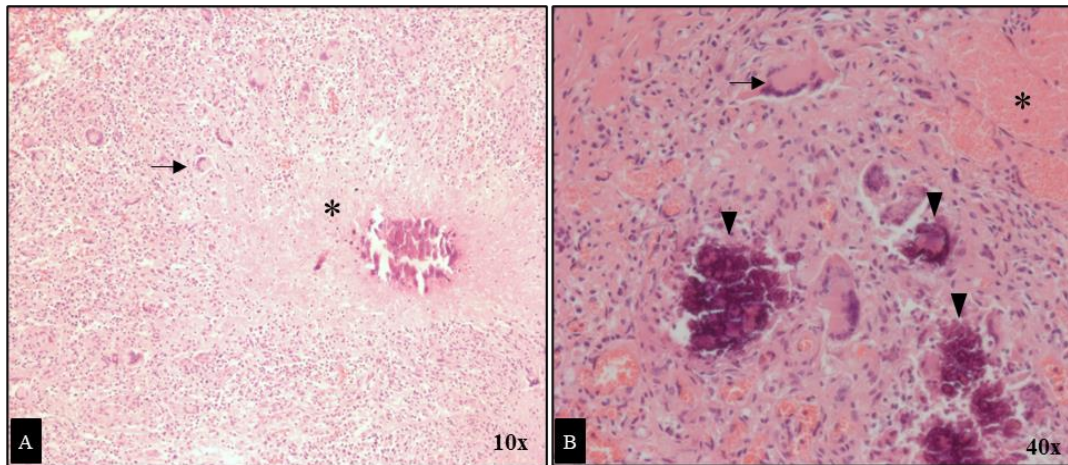
fibroso se podría asociar a un estadio más avanzado del granuloma; normalmente la presencia de los fibroblastos se da en respuesta a un daño y surge como evento reparador de tejido, por lo que encontrarlo en las lesiones podría indicarnos que el evento es crónico y se está intentando delimitar. Por lo tanto, la ausencia de este componente indicaría que se trata de un estadio más temprano en la formación del granuloma. Como consecuencia de la necrosis, podemos encontrar mineralización, en estos casos de tipo distrófica.



**Figura 23. Hallazgos microscópicos observados en la neumonía granulomatosa.**

**A:** histología de pulmones sanos. **B:** caso 8. Formación de granuloma; al centro se aprecia un espacio claro que corresponde a la pérdida del parénquima; esta área está rodeada por material acelular eosinofílico correspondiente con necrosis. Entremezclados en esta área se observan macrófagos espumosos, linfocitos y células gigantes tipo Langhans (flecha). Además, se aprecia un área hiperbasofílica que corresponde con áreas de mineralización (círculo punteado). Alrededor de todo este tejido se encuentra una matriz de tejido conectivo fibroso entremezclado con linfocitos y macrófagos delimitando el proceso inflamatorio (asterisco). **C:** caso 8. Los espacios alveolares se encuentran ocupados y en algunas áreas reemplazados por edema (asterisco). Alrededor de esta zona hay numerosas células gigantes tipo Langhans (flecha) entremezcladas con linfocitos y áreas de necrosis.



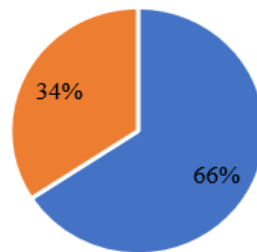


**Figura 24. Hallazgos microscópicos observados en la neumonía granulomatosa.**

**A:** caso 31. Inflamación granulomatosa, al centro se observa el centro necrótico y una zona de mineralización (asterisco). A la periferia hay infiltrado inflamatorio mononuclear y células gigantes tipo Langhans (flecha). **B:** caso 27. Se observan áreas de congestión (asterisco). Los alvéolos se encuentran reemplazados por material celular amorfo entremezclado con células inflamatorias mononucleares y células gigantes tipo Langhans (flecha). Se observan varias zonas hiperbasofílicas que corresponden con mineralización (punta de flecha).

Es importante mencionar que de todos los casos evaluados, solo el 66% (25 casos) presentó un solo tipo de proceso inflamatorio, con presencia o no de exudado mixto, mientras que el 34 % (13 casos) presentó más de un proceso inflamatorio afectando el parénquima pulmonar (Figura 25); estos procesos estaban bien delimitados en distintos lóbulos pulmonares.

■ 1 proceso ■ 2 procesos



**Figura 25. Procesos inflamatorios involucrados en los casos de neumonías evaluados.**

Para la elaboración de los diagnósticos morfológicos microscópicos, las lesiones fueron gradificadas por región anatómica (bronquio, bronquiolo, alvéolo, intersticio y pleura),

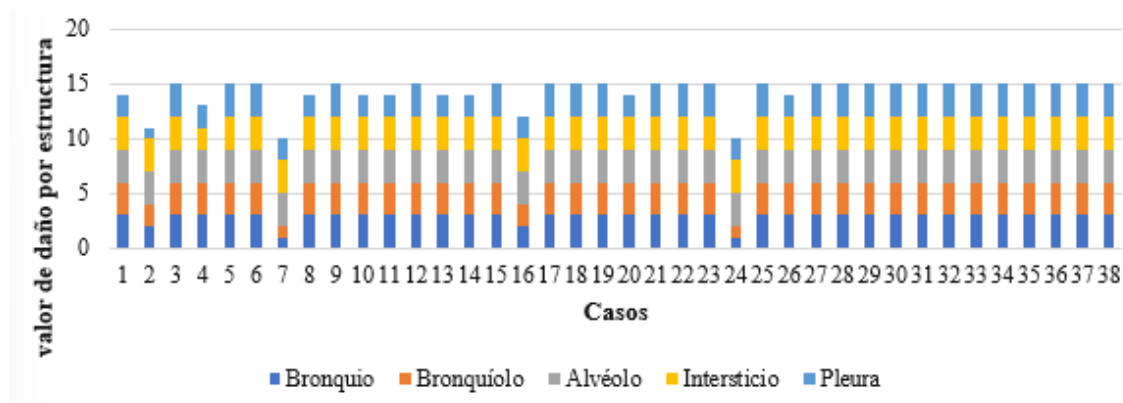
además de contemplar el tipo de infiltrado y la distribución, tal como se describió en la metodología (Figura 26 y Tabla 10).

En 25 casos (66 %) todas las estructuras evaluadas alcanzaron la puntuación máxima de daño, sumando 15 puntos; esto indica que el proceso inflamatorio dañó gravemente el parénquima pulmonar. El alvéolo fue la estructura más afectada, ya que en todos los casos los alvéolos tuvieron 3 puntos (+++), lo que representa un daño al tejido mayor al 50%. Después del alvéolo, el área más afectada fue el intersticio, lo cual tiene sentido porque este espacio se encuentra alrededor de los alvéolos y al estar en íntimo contacto, es de esperar que estén afectados.

Los bronquios y bronquiolos se vieron afectados por igual en cada caso; únicamente 4 casos, 2, 7, 16 y 24 no tuvieron la puntuación máxima de daño. Estos fueron diagnosticados como neumonía intersticial, por tanto tiene sentido que los bronquios y bronquiolos, así como la pleura, no estén gravemente afectados. De estos, el caso 24 y el 7, presentaron también bronconeumonía supurativa, lo cual explica la lesión leve en bronquios y bronquiolos.

Respecto a la pleura, 24 casos tuvieron la puntuación máxima de daño (+++) lo que respalda la gravedad y cronicidad del proceso inflamatorio, ya que el daño inicial en un proceso neumónico bacteriano (considerando que la vía de entrada es aerógena) normalmente inicia en bronquios, después en los bronquiolos y sigue con alvéolos, desde los cuales puede extenderse al intersticio, espacios interlobulillares y pleura.

En general, los datos de gradificación de lesiones muestran que el daño en el parénquima pulmonar de todos los casos fue grave y que este daño puede estar asociado a múltiples patógenos bacterianos, únicos o en sinergia.



**Figura 26. Gradificación de lesiones por región anatómica en cada caso.**

**Tabla 10. Gradificación de las lesiones pulmonares.**

| Número de caso | Estructuras pulmonares evaluadas |     |     |     |     | Infiltrado | Distribución         |
|----------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------|----------------------|
|                | Br                               | Brl | Alv | Int | Pl  |            |                      |
| 1              | ++                               | ++  | +++ | +++ | ++  | S-H-P      | Zonalmente extensiva |
| 2              | ++                               | ++  | +++ | +++ | +   | S-H-P      | Generalizada         |
| 3              | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H-P      | Generalizada         |
| 4              | +++                              | +++ | +++ | ++  | ++  | S          | Zonalmente extensiva |
| 5              | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H        | Generalizada         |
| 6              | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H        | Generalizada         |
| 7              | +                                | +   | +++ | +++ | ++  | H-P        | Generalizada         |
| 8              | +++                              | +++ | +++ | +++ | ++  | S-H-L-G    | Generalizada         |
| 9              | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | H-P        | Multifocal           |
| 10             | +++                              | +++ | +++ | +++ | ++  | S-H        | Generalizada         |
| 11             | +++                              | +++ | +++ | +++ | ++  | S-H-P      | Generalizada         |
| 12             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | H-P-L-G    | Generalizada         |
| 13             | +++                              | +++ | +++ | +++ | ++  | H-P        | Generalizada         |
| 14             | +++                              | +++ | +++ | +++ | ++  | H          | Zonalmente extensiva |
| 15             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H-P      | Zonalmente extensiva |
| 16             | ++                               | ++  | +++ | +++ | ++  | H          | Generalizada         |
| 17             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H        | Zonalmente extensiva |
| 18             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H        | Generalizada         |
| 19             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H        | Generalizada         |
| 20             | +++                              | +++ | +++ | +++ | ++  | S-H-P      | Generalizada         |
| 21             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H-P      | Generalizada         |
| 22             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | H-P        | Generalizada         |
| 23             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H        | Generalizada         |
| 24             | +                                | +   | +++ | +++ | ++  | H-P        | Generalizada         |
| 25             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H-L-G    | Generalizada         |
| 26             | +++                              | +++ | +++ | +++ | ++  | S-H        | Zonalmente extensiva |
| 27             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-L-G      | Generalizada         |
| 28             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H        | Generalizada         |
| 29             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | H-P        | Generalizada         |
| 30             | +++                              | +++ | +++ | +++ | +++ | S          | Generalizada         |

|           |     |     |     |     |     |       |                         |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------------------------|
| <b>31</b> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | S-L-G | Generalizada            |
| <b>32</b> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | H-P   | Generalizada            |
| <b>33</b> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H-P | Generalizada            |
| <b>34</b> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H   | Generalizada            |
| <b>35</b> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | S     | Generalizada            |
| <b>36</b> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H   | Zonalmente<br>extensiva |
| <b>37</b> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | S-H   | Zonalmente<br>extensiva |
| <b>38</b> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | H-P   | Generalizada            |

**Br:** bronquio, **Brl:** bronquiolo, **Alv:** alvéolo, **Int:** intersticio, **Pl:** pleura, **S:** supurativo, **H:** histiocítico, **P:** plasmocítico, **L:** células tipo Langhans, **G:** granuloma. (+, 1 punto): daño leve, entre el 1% y el 20%; (++, 2 puntos): daño moderado, entre 20% y 50%); (+++, 3 puntos): daño grave, mayor al 50%.

Una vez identificados los componentes del proceso inflamatorio, así como la distribución y gravedad, se realizó el diagnóstico morfológico microscópico con base en las características microscópicas descritas por Caswell & Williams (2016) y López & Martinson en el (2017), y considerando todos los elementos inflamatorios ya descritos en cada caso (Tabla 11).

**Tabla 11. Diagnósticos morfológicos microscópicos de los casos.**

| <b>Número de caso</b> | <b>Diagnóstico morfológico microscópico</b>   |
|-----------------------|---|
| <b>1</b>              | Bronconeumonía supurativa e histiocítica grave zonalmente extensiva y neumonía intersticial moderada zonal.                                     |
| <b>2</b>              | Neumonía intersticial linfocítica grave generalizada con múltiples áreas de hemorragia.   |
| <b>3</b>              | Bronconeumonía supurativa y linfocítica grave zonal con múltiples áreas de necrosis.  |
| <b>4</b>              | Bronconeumonía fibrinosupurativa grave generalizada con reacción granulomatosa.   |
| <b>5</b>              | Bronconeumonía fibrinosupurativa grave generalizada con abundante fibrina en los espacios interlobulillares.                                    |
| <b>6</b>              | Neumonía broncointersticial histiocítica y neumonía supurativa grave zonal. Presencia de hifas septadas e hiperplasia linfoide peribronquiolar. |
| <b>7</b>              | Neumonía broncointersticial linfocítica grave generalizada.   |
| <b>8</b>              | Neumonía granulomatosa grave multifocal con extensas áreas de necrosis y bronconeumonía linfocítica grave zonalmente extensiva.                 |
| <b>9</b>              | Neumonía piogranulomatosa grave zonal y neumonía intersticial histiocítica moderada zonal.  |
| <b>10</b>             | Bronconeumonía supurativa grave generalizada con múltiples áreas de necrosis  |
| <b>11</b>             | Neumonía piogranulomatosa grave generalizada  |

|    |   |
|----|---|
| 12 | Bronconeumonía granulomatosa grave generalizada y neumonía linfohistiocítica grave zonal.   |
| 13 | Neumonía broncointersticial linfohistiocítica grave generalizada.   |
| 14 | Bronconeumonía fibrinosupurativa grave zonalmente extensiva.  |
| 15 | Bronconeumonía fibrinosupurativa grave zonalmente extensiva.  |
| 16 | Neumonía intersticial grave generalizada.   |
| 17 | Bronconeumonía supurativa e histiocítica grave generalizada y neumonía broncointersticial moderada zonal.                           |
| 18 | Neumonía piogranulomatosa grave multifocal.   |
| 19 | Bronconeumonía supurativa grave generalizada con presencia de múltiples macrófagos epitelioides.                                    |
| 20 | Bronconeumonía supurativa grave generalizada con múltiples áreas de congestión.   |
| 21 | Neumonía fibrinosupurativa grave zonal y neumonía intersticial histiocítica grave generalizada                                      |
| 22 | Neumonía fibrinosupurativa grave y neumonía intersticial linfohistiocítica grave generalizada.                                      |
| 23 | Bronconeumonía fibrinosupurativa generalizada con extensas áreas de necrosis.   |
| 24 | Neumonía broncointersticial histiocítica grave generalizada.  |
| 25 | Bronconeumonía fibrinosupurativa grave generalizada con múltiples áreas de necrosis y neumonía granulomatosa grave multifocal..     |
| 26 | Neumonía piogranulomatosa grave zonalmente extensiva y neumonía broncointersticial grave zonal.                                     |
| 27 | Neumonía granulomatosa grave zonalmente extensiva.  |
| 28 | Bronconeumonía fibrinosupurativa grave generalizada y neumonía broncointersticial moderada zonal.                                   |
| 29 | Neumonía intersticial grave generalizada.   |
| 30 | Bronconeumonía supurativa grave generalizada.   |
| 31 | Neumonía granulomatosa grave generalizada.  |
| 32 | Neumonía intersticial grave generalizada  |
| 33 | Neumonía piogranulomatosa grave multifocal y neumonía intersticial grave zonal y extensas áreas de necrosis.                        |
| 34 | Neumonía supurativa grave generalizada con extensas áreas de necrosis.  |
| 35 | Bronconeumonía fibrinonecrótica grave zonalmente extensiva y neumonía intersticial grave multifocal.                                |
| 36 | Neumonía piogranulomatosa grave zonalmente extensiva con extensas áreas de necrosis.  |
| 37 | Bronconeumonía fibrinosupurativa grave zonalmente extensiva y neumonía piogranulomatosa grave zonal con extensas áreas de necrosis. |
| 38 | Neumonía intersticial grave generalizada.   |

### 7.3. Extracción de ADN

Una vez realizado el análisis macroscópico y microscópico de cada caso, se continuó con la extracción de ADN de los pulmones embebidos en bloques de parafina. Un total de 38 muestras fueron procesadas para la obtención de ADN, el cual fue cuantificado (Tabla 12).

**Tabla 12. Cuantificación de ADN extraído a partir de las muestras de pulmón de bovino embebidas en parafina.**

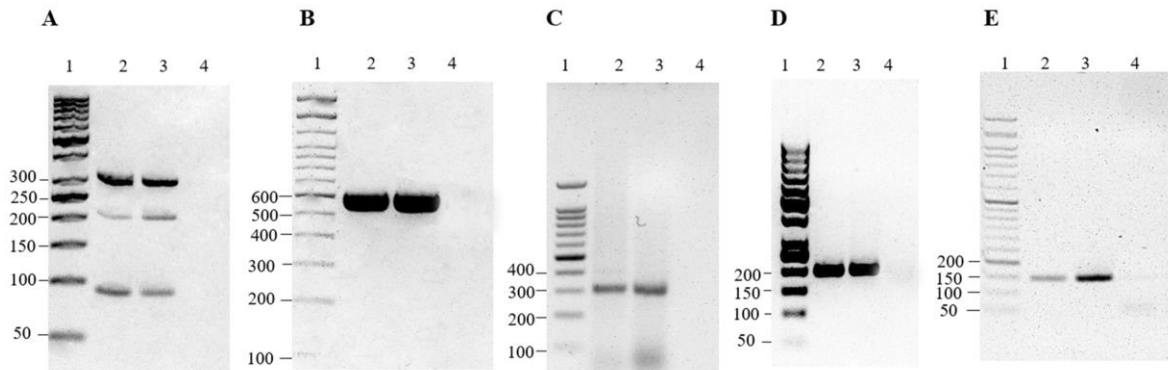
| Número de caso | ADN ng/μl | Número de caso | ADN ng/ μl |
|----------------|-----------|----------------|------------|
| 1              | 1339.5    | 21             | 3829.75    |
| 2              | 355.34    | 22             | 844.75     |
| 3              | 2928.03   | 23             | 290.68     |
| 4              | 2562.03   | 24             | 783.36     |
| 5              | 1246.02   | 25             | 193.66     |
| 6              | 715.6     | 26             | 348.49     |
| 7              | 1194.42   | 27             | 115.2      |
| 8              | 2199.82   | 28             | 1089.95    |
| 9              | 88        | 29             | 297.95     |
| 10             | 2696.32   | 30             | 67.89      |
| 11             | 27.52     | 31             | 26.81      |
| 12             | 462.33    | 32             | 161.58     |
| 13             | 170.59    | 33             | 1333.34    |
| 14             | 109.86    | 34             | 48.19      |
| 15             | 784.86    | 35             | 282.15     |
| 16             | 1840.23   | 36             | 215.28     |
| 17             | 1186.5    | 37             | 1921.1     |
| 18             | 261.01    | 38             | 371.78     |
| 19             | 329.6     |                |            |
| 20             | 292.81    |                |            |

### 7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Empleando el ADN extraído de las cepas ATCC se estandarizaron las condiciones de amplificación de los genes de cada uno de los microorganismos a identificar en las muestras de pulmones (Figura 27).

Para *Mannheimia haemolytica* se amplificó el gen de la subunidad ribosomal 16S (304 pb), el gen de la leucotoxina, *lkt* (206 pb) y el gen de una proteína hipotética, HP (90 pb) (Figura 27A). Para *Pasteurella multocida* se amplificó el gen de un regulador transcripcional, *pm0762* (597 pb) (Figura 27B). Para *Histophilus somni* y *Mycoplasma bovis* se amplificó un

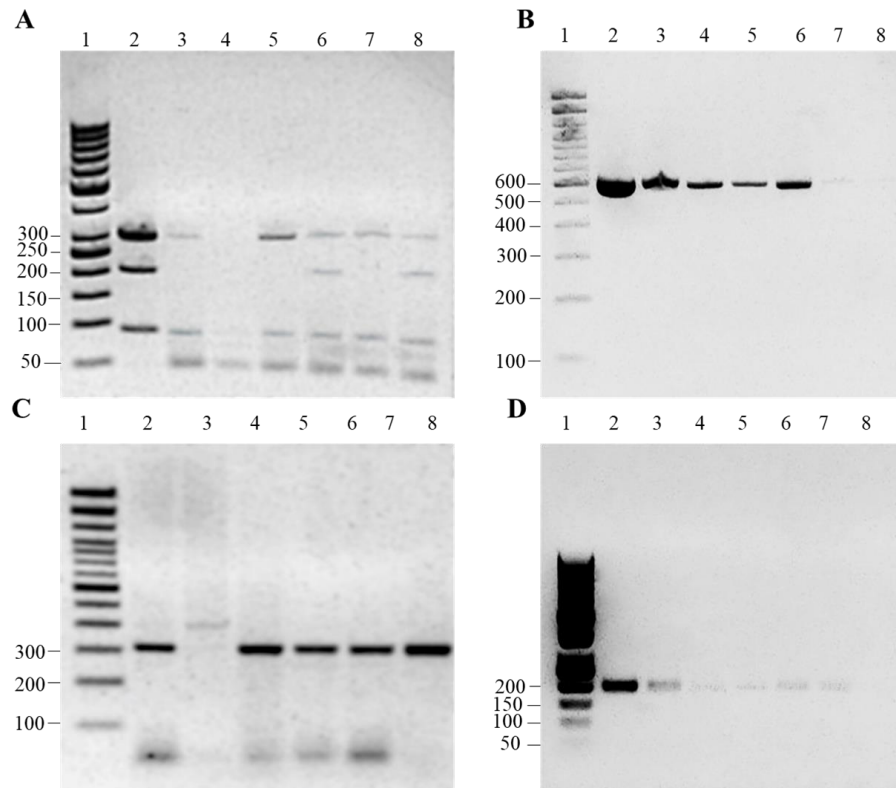
fragmento del gen 16S conservado en cada una de ellas (314 pb y 198 pb, respectivamente) (Figura 27C y D). Para *Trueperella pyogenes* se amplificó el gen de la piolisina, *plo* (150 pb) (Figura 27E); sin embargo no se contaba con cepa ATCC por lo que aquellos primeros fragmentos amplificados de las muestras de pulmón se purificaron y se enviaron a secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM para confirmar que correspondían a *T. pyogenes* y posteriormente estos fueron utilizados como controles positivos para el resto de las muestras.



**Figura 27. Electroforesis de los productos de amplificación empleados como controles positivos.**

**A:** *M. haemolytica*. **B:** *P. multocida*. **C:** *H. somni*. **D:** *M. bovis*. **E:** *T. pyogenes*. Carril 1: MPM (A, D y E 50 pb; B y C 100 pb). Carriles 2-3: controles positivos. Carriles 4: Controles negativos.

Después de haber estandarizado las reacciones con los controles positivos, se continuó con las PCRs empleando el ADN extraído de las muestras de pulmón de los 38 bovinos analizados. En la figura 28 se muestran algunos casos positivos representativos de cada género identificado y en la Tabla 13 se muestran los genes amplificados en cada uno de los 38 casos.



**Figura 28. Electroforesis de los productos de amplificación a partir de las muestras de pulmones de bovinos.**

**A:** *Mannheimia* spp., genes 16s (304 pb), *lkt* (206 pb) y *hp* (90 pb). **B:** *P. multocida*, gen *pm0762* (597 pb). **C:** *H. somni*, gen *16S* (314 pb). **D:** *M. bovis*, gen *16s* (198 pb). Carriles 1: MPM (A, D y E 50 pb; B y C 100 pb). Carriles 2: controles positivos. Carriles 3-8: muestras de bovinos.

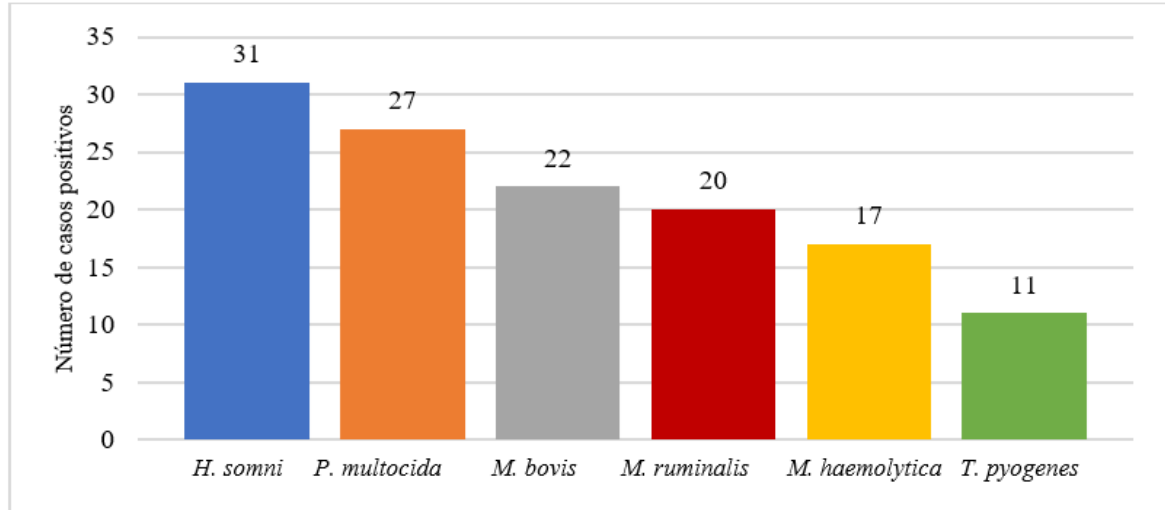


**Tabla 13. Resultados de las PCRs realizadas con las muestras de los pulmones de bovinos.**

Con (+) se indica las PCRs positivas y con (-) las PCRs negativas.

| Número de caso | <i>16S Mannheimia spp</i> | <i>lkt HP</i> | <i>pm0762 P. multocida</i> | <i>16S M. bovis</i> | <i>16S H. somni</i> | <i>plo T. pyogenes</i> |   |
|----------------|---------------------------|---------------|----------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|---|
| 1              | +                         | -             | +                          | +                   | -                   | +                      | - |
| 2              | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 3              | +                         | -             | +                          | +                   | -                   | +                      | - |
| 4              | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 5              | +                         | -             | +                          | +                   | -                   | -                      | + |
| 6              | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | -                      | + |
| 7              | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 8              | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 9              | +                         | +             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 10             | +                         | -             | +                          | +                   | -                   | +                      | - |
| 11             | +                         | +             | +                          | -                   | +                   | +                      | + |
| 12             | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | +                      | + |
| 13             | +                         | +             | +                          | -                   | +                   | +                      | - |
| 14             | +                         | +             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 15             | +                         | -             | +                          | -                   | +                   | +                      | - |
| 16             | +                         | -             | +                          | -                   | -                   | -                      | - |
| 17             | +                         | -             | +                          | -                   | +                   | -                      | - |
| 18             | +                         | +             | +                          | -                   | -                   | -                      | - |
| 19             | +                         | +             | +                          | -                   | -                   | +                      | - |
| 20             | +                         | +             | +                          | -                   | -                   | +                      | - |
| 21             | +                         | +             | +                          | -                   | +                   | +                      | - |
| 22             | +                         | +             | +                          | +                   | +                   | +                      | + |
| 23             | +                         | +             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 24             | +                         | +             | +                          | -                   | +                   | +                      | - |
| 25             | +                         | +             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 26             | +                         | +             | +                          | +                   | -                   | +                      | - |
| 27             | -                         | -             | -                          | +                   | -                   | +                      | - |
| 28             | +                         | +             | +                          | +                   | +                   | +                      | - |
| 29             | +                         | +             | +                          | +                   | -                   | +                      | + |
| 30             | +                         | +             | +                          | +                   | -                   | +                      | + |
| 31             | +                         | -             | +                          | +                   | -                   | +                      | - |
| 32             | +                         | -             | +                          | -                   | -                   | +                      | + |
| 33             | +                         | +             | +                          | -                   | +                   | +                      | - |
| 34             | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | -                      | - |
| 35             | +                         | -             | +                          | +                   | -                   | +                      | - |
| 36             | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | -                      | + |
| 37             | +                         | -             | +                          | +                   | +                   | +                      | + |
| 38             | +                         | -             | +                          | +                   | -                   | +                      | + |

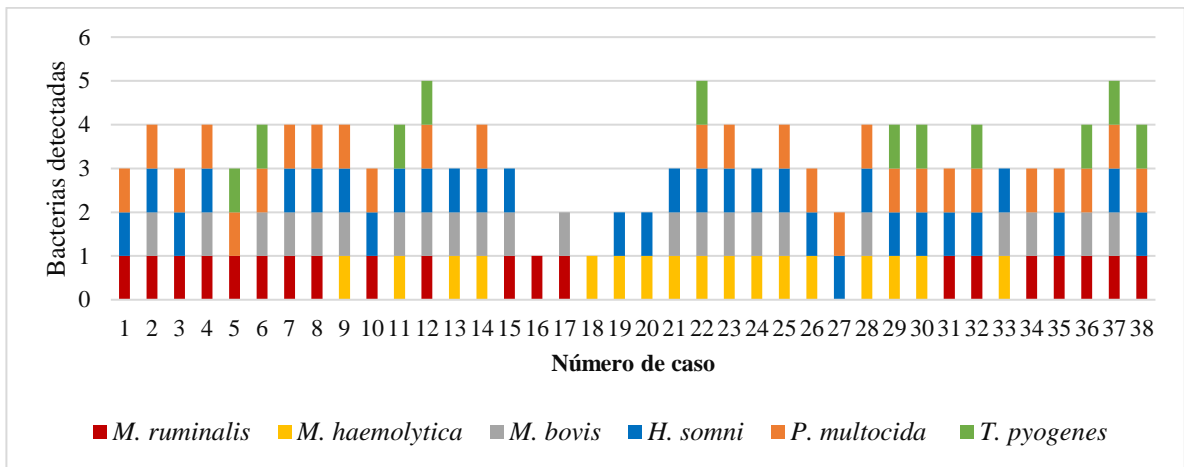
El género bacteriano más frecuente entre los casos fue *H. somni* (31 casos), seguido de *P. multocida* (27 casos), *M. bovis* (22 casos), *M. ruminalis* (20 casos), *M. haemolytica* (17 casos) y *T. pyogenes* (11 casos) (Figura 29).



**Figura 29. Número de casos en los que se detectaron los diferentes géneros bacterianos.**

La figura 30 muestra las bacterias que fueron identificadas en cada caso. Se observa que únicamente los casos 16 y 18 presentaron una especie bacteriana. En el caso 16 se detectó a *M. ruminalis* y microscópicamente se diagnosticó como neumonía intersticial. Por otro lado, en el caso 18 se detectó a *M. haemolytica* (Tabla 13) microscópicamente se diagnosticó como neumonía piogranulomatosa; lo que probablemente sugiere la presencia de otros microorganismos asociados con *Mannheimia*.

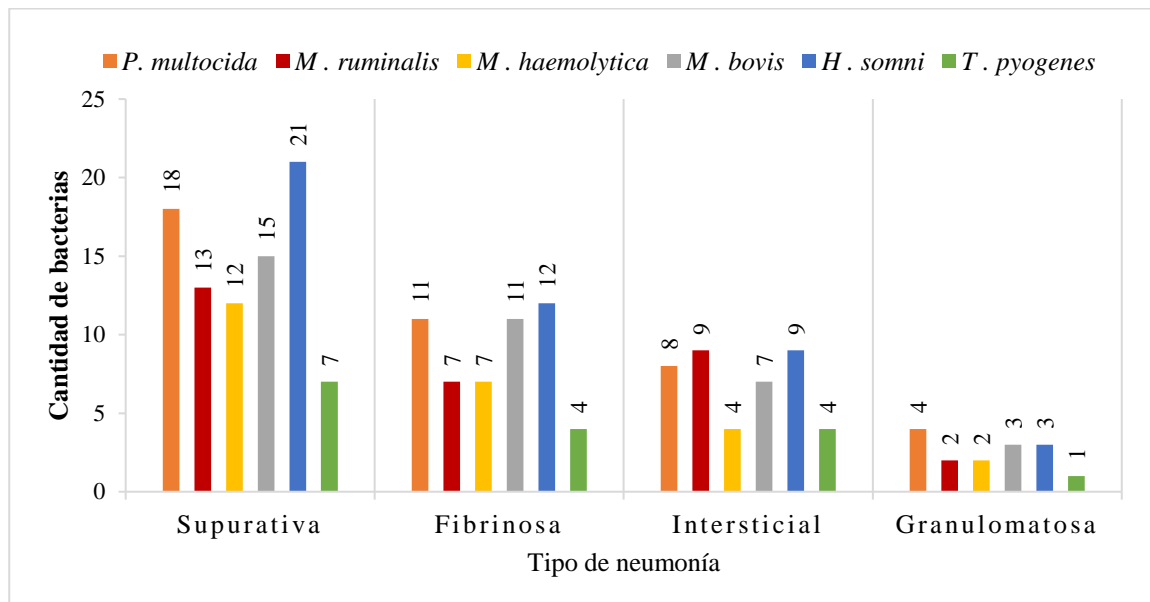
En cuatro casos se encontraron 2 especies bacterianas, en 13 casos se encontraron 3 especies, en 16 casos, 4 especies y en 3 casos 5 especies bacterianas. Indistintamente, la mayoría de los casos tuvo una puntuación de daño superior a 12, lo que quiere decir que las estructuras pulmonares se encontraban afectadas en más de un 50%. No se encontró relación entre la cantidad de bacterias detectadas y la puntuación de daño.



**Figura 30. Bacterias encontradas en cada caso.**

### 7.5. Relación entre los diagnósticos morfológicos y la identificación de los géneros bacterianos

Una vez detectadas las bacterias presentes en cada uno de los casos, se compararon estos resultados con el diagnóstico morfológico, con el fin de establecer asociaciones y analizar qué bacterias podrían estar involucradas en cada tipo de neumonía (Figura 31).



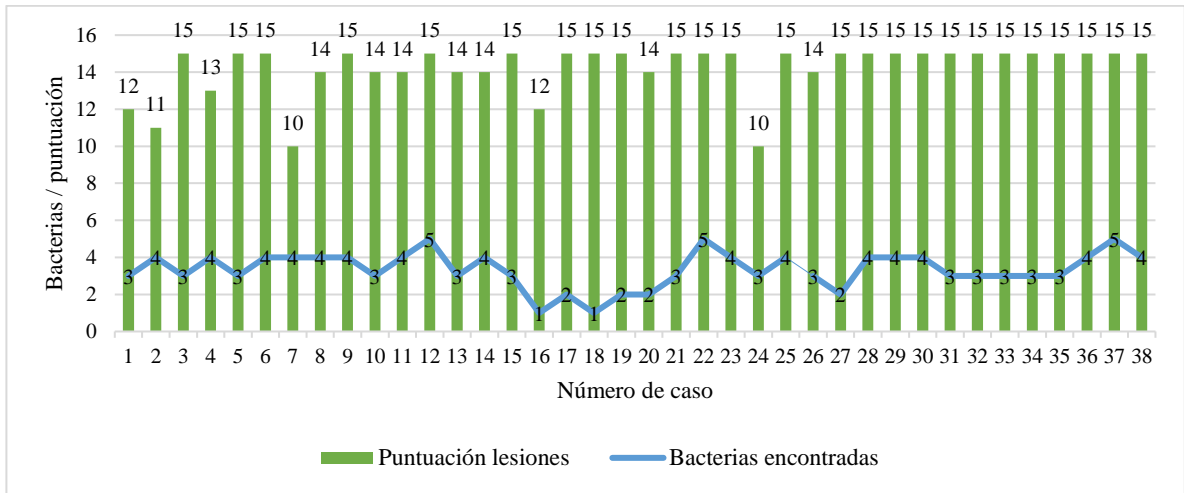
**Figura 31. Gráfica de las diferentes bacterias en relación con el tipo de neumonía.**  
Frecuencia de especies bacterianas detectadas en cada tipo de neumonía.

Las 6 bacterias detectadas por PCR (*M. haemolytica*, *M. ruminalis*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes*) se encontraron involucradas en mayor o menor frecuencia en los cuatro tipos de neumonía estudiados (bronconeumonía supurativa, bronconeumonía fibrinosa, neumonía intersticial y neumonía granulomatosa). Considerando que el 46% del total de los casos se diagnosticó como bronconeumonía supurativa, 24% como bronconeumonía fibrinosa, 23% como neumonía intersticial y 7% como neumonía granulomatosa, tiene sentido que haya más bacterias involucradas en la bronconeumonía supurativa, ya que fue ésta la clasificación donde se agruparon la mayoría de los casos. En esta clasificación se observa que la bacteria más frecuentemente encontrada fue *H. somni*, seguida de *P. multocida*, *M. bovis*, *M. ruminalis*, *M. haemolytica* y *T. pyogenes*. En la bronconeumonía fibrinosa se observa la misma tendencia.

Con respecto a la neumonía intersticial, *H. somni* y *M. ruminalis* estuvieron presentes en 9 casos, *P. multocida* en 8, *M. bovis* en 7, *M. haemolytica* y *T. pyogenes* en 4 casos. Esto pone en evidencia que cualquiera de las 5 bacterias de interés puede estar relacionada con cualquier tipo de neumonía de acuerdo con la clasificación utilizada en este estudio.

En la neumonía granulomatosa se encontraron también los 5 géneros. Con mayor frecuencia se encontró a *P. multocida* en 4 casos, *M. bovis* e *H. somni* en 3 casos, *M. ruminalis*, *M. haemolytica* en 2 casos y *T. pyogenes* en 1 caso.

Posterior a esto, se realizó un análisis para evaluar la relación de la cantidad de géneros/especies bacterianas presentes en cada caso y la puntuación de daño (Figura 32). Con este análisis se observó que no hubo ninguna tendencia ni relación bacteria/puntuación de daño, tomando en cuenta que la mayor puntuación es 15 y la mayor cantidad de bacterias es 5. Por ejemplo, en los casos 16 y 18 se encontró solo una especie bacteriana y aun así, el daño es severo con una puntuación de 12/15 y 15/15, respectivamente. En algunos casos como el 7 y 24 se detectaron 4 y 3 géneros bacterianos, respectivamente y en ambos el puntaje de daño fue 10 puntos (Figura 32). Estos datos confirman que no existe relación directa entre el grado de daño y la cantidad de bacterias involucradas en el proceso. Tampoco se encontró que alguna bacteria en particular estuviera en todos los casos con mayor puntuación, o ausente en los de menor puntuación de daño.



**Figura 32. Gráfica de la cantidad de bacterias encontradas en cada caso y la puntuación de daño del parénquima pulmonar.**

Relación entre la cantidad de bacterias detectadas en cada caso y la puntuación de daño del parénquima pulmonar.

En conjunto, nuestros datos muestran que las lesiones del parénquima pulmonar son muy variadas y aunque tengan un patrón de distribución, este no siempre coincide con el agente causal al que se le ha asociado en la literatura.

No se encontraron patrones de daño específicos para una especie bacteriana en particular; en todos los casos había particularidades y distintos grados de afecciones. Este hecho se entiende debido a que el proceso inflamatorio que se desencadena en el parénquima pulmonar es muy variado entre cada individuo por lo que la presencia de alguna bacteria en particular no refleja un mismo patrón de daño en todos los individuos.

## 8. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue identificar a los principales agentes bacterianos asociados con neumonías en bovinos, para lo cual se trabajó con muestras de pulmón de bovinos neumónicos en las que se realizó el diagnóstico morfológico macro y microscópico y se determinó mediante PCR la presencia de bacterias comúnmente asociadas a estos procesos, tales como *M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes*.

Entre los hallazgos macroscópicos más importantes de este trabajo se destaca que el tipo de neumonía más frecuente fue la bronconeumonía supurativa (42%, 16 casos de 38). Macroscópicamente este tipo de neumonía se caracteriza por la consolidación bien delimitada de los lóbulos craneales; dentro de esta clasificación se pueden encontrar patrones morfológicos variados, por ejemplo, el patrón de tablero de ajedrez irregular que corresponde a la mezclas de lobulillos sanos y lobulillos consolidados. Las diferentes lesiones macroscópicas que se observaron dentro de esta clasificación, así como su distribución, son resultado de varios factores. Uno de los más importantes son los patógenos involucrados y la cronicidad. Conforme avanza el proceso inflamatorio puede extenderse a los demás lóbulos, o incluso compartimentalizarse; como resultado de este observamos la bronquiectasia o los abscesos, en un intento del organismo por mantener la inflamación localizada (Caswell y William, 2017).

En los casos diagnosticados como bronconeumonía supurativa se detectaron las 5 bacterias de interés y *M. ruminalis*; sin embargo, las bacterias detectadas con mayor frecuencia fueron *H. somni* y *P. multocida*.

Los casos de bronconeumonía causada por *H. somni* están relacionados con bronconeumonía supurativa y fibrinosa. En las bronconeumonías, las regiones craneoventrales del pulmón suelen estar consolidadas y tanto los alvéolos como los bronquiolos pequeños pueden estar llenos de neutrófilos, macrófagos, fibrina, edema, eritrocitos, restos celulares y agregados de bacterias. La fibrina se debe a los cambios vasculares ocasionados por *H. somni*, aunque no se comprende con exactitud cómo es que *H. somni* promueve este daño vascular. El daño al parénquima pulmonar se le atribuye en mayor medida al LOS que puede inducir la activación de caspasas y por tanto la apoptosis en células endoteliales bovinas (Kuckleburg *et al.*, 2008) y a la proteína de unión a inmunoglobulina A (IbpA) que es capaz de generar la muerte de las células endoteliales al inactivar las Rho GTPasas de las células del hospedero, provocando así el colapso del citoesqueleto (Zekarias *et al.*, 2010; Caswell y William, 2017).

Por otro lado, *P. multocida* posee fimbrias, factores de adherencia, enzimas extracelulares (neuraminidasa, hialuronidasa y superóxido dismutasa) y una gran variedad de proteínas de membrana externa que pueden funcionar como PAMPs e interactuar con los TLR de los

macrófagos alveolares y favorecer el reclutamiento de neutrófilos tras su activación, sin embargo, el LPS es el factor de virulencia más importante de esta bacteria. El LPS interactúa con el receptor CD14 en la superficie de los macrófagos alveolares; esta interacción da como resultado la liberación de citocinas proinflamatorias lo que resulta en la atracción de más células inflamatorias (neutrófilos) y de ahí la presencia de piocitos en la bronconeumonía supurativa (Harper *et al.*, 2006; Snyder y Credille, 2020).

La bronconeumonía supurativa ha sido reportada en otros estudios como el tipo de neumonía más común en los bovinos (Pancieria y Confer, 2010; Murray *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2020). A pesar de las diferencias reportadas en estos estudios, tales como la localización geográfica y tamaño de muestra, es probable que este sea el tipo de neumonía más común debido a la impactación de los patógenos en la entrada del pulmón por la estrechez de las vías aéreas en esa porción, donde por gravedad sedimentan en los lóbulos craneales y comienza la colonización bacteriana. Como regla general, los patógenos que causan la bronconeumonía llegan a los pulmones a través del aire inspirado (vía aerógena), ya sea por aerosoles infectados o por arrastre de la microbiota del tracto respiratorio superior (López y Martinson, 2017).

Los resultados del presente estudio coinciden con lo reportado por Murray *et al.* (2017), quienes refieren infiltrado polimorfonuclear (piocitos) y macrófagos alveolares desde la unión broncoalveolar hasta los alvéolos. También con lo reportado por Fernández *et al.* (2020) quienes reportaron neutrófilos y macrófagos activados que ocupan la luz bronquioalveolar y además observaron áreas correspondientes con atelectasia, asociadas a oclusión de la luz bronquiolar por exudado inflamatorio.

Los diferentes hallazgos microscópicos en la bronconeumonía supurativa dependen de la etapa en la que se encuentre el proceso inflamatorio, como lo describen López y Martinson (2017). La lesión inicial en las bronconeumonías se centra en la mucosa de los bronquiolos y desde allí, el proceso inflamatorio puede extenderse hacia los bronquios y a los alvéolos a través de los poros de Kohn. El exudado se puede expectorar y luego aspirar, de modo que llega a otros lóbulos pulmonares y entonces el proceso inflamatorio se propaga. En las primeras etapas de la bronconeumonía, hay hiperemia activa en los vasos sanguíneos pulmonares; los bronquios, bronquiolos y alvéolos contienen edema provocado por el aumento de la permeabilidad vascular. Si la infección no logra ser controlada por el hospedero, eventualmente el daño pulmonar progresará a una fase crónica de modo que se genera atelectasia obstructiva (por el exudado), infiltrado de células mononucleares, hiperplasia linfoide peribronquial y peribronquiolar y fibrosis alveolar (Caswell y Williams, 2016).

El segundo tipo de neumonía más frecuente en este estudio fue la bronconeumonía fibrinosa (13 casos, 34%). Al igual que nuestro estudio, Fernández *et al.* (2020) reportaron que la bronconeumonía fibrinosa fue el segundo tipo de bronconeumonía más común y reportan las mismas lesiones que nosotros: consolidación de los lóbulos craneales así como de múltiples lobulillos, depósito de exudado fibrinoso y múltiples áreas de congestión. En nuestro estudio, en todos los casos la arquitectura del parénquima pulmonar se vio afectada y más del 50% del pulmón en cada caso presentó depósito de fibrina en los lóbulos craneales y caudales.

En la bronconeumonía fibrinosa, las bacterias también impactan en la primera porción de la entrada del pulmón, sedimentan y comienzan su colonización, pero si la colonización bacteriana persiste, se vuelve crónica. En ocasiones la carga bacteriana puede ser tan elevada que no permite que el proceso progrese y la muerte del animal es más rápida; también debe considerarse que aunque la carga bacteriana no sea tan alta, la patogenicidad, sinergia de las bacterias y respuesta inmune del hospedero pueden determinar el curso de la enfermedad y el desarrollo de las lesiones. Macroscópicamente, las primeras etapas de las bronconeumonías fibrinosas se caracterizan por congestión severa y hemorragia, lo que da a los pulmones afectados un color rojo intenso; conforme avanza la infección, se comienza a apreciar el depósito de fibrina (Pancieria y Confer, 2010; López y Martinson, 2017).

Como observamos, en los casos 1, 10, 13-15, 18, 21-23, 25, 35, 36 y 38 que fueron clasificados como neumonía fibrinosa, se identificó a *M. haemolytica*, *H. somni* y/o *M. bovis*, lo cual explica la aparición de hemorragias y depósito de fibrina, pues estos microorganismos poseen factores de virulencia que generan daño al endotelio vascular favoreciendo así el depósito de fibrina sobre la superficie pleural. En el caso de *M. haemolytica*, el LPS interactúa con el receptor CD14 de macrófagos y se libera TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , lo cual produce fugas vasculares, generando así el edema y acumulación de fibrina (Snyder y Credille, 2020). IbpA y el LOS de *H. somni* inducen un mecanismo similar al de *M. haemolytica* y la retracción del endotelio por parte de IbpA (Zekarias *et al.*, 2010), mientras que la NOX de *M. bovis* daña el endotelio vascular por el estallido oxidativo que produce (Josi *et al.*, 2019).

Con respecto a la neumonía intersticial, López y Martinson (2017) refieren tres características macroscópicas importantes: (1) incapacidad de los pulmones para colapsar cuando se abre la cavidad torácica, (2) la presencia ocasional de impresiones de costillas en la superficie pleural del pulmón y (3) la falta de exudados visibles en las vías respiratorias, lo que concuerda con las características encontradas en nuestro estudio. Este tipo de neumonía es la más difícil de diagnosticar, porque se requiere análisis microscópico para confirmar la hiperplasia de neumocitos tipo II que se da para reemplazar a los neumocitos tipo I dañados. Microscópicamente se detectó daño alveolar generalizado, lesiones tanto en neumocitos como en células endoteliales, edema, formación de membranas hialinas, hemorragias, fibrosis intersticial, hiperplasia de neumocitos tipo II y un leve infiltrado de células



inflamatorias mononucleares. Nuestros hallazgos coinciden con lo informado por Murray *et al.* (2017), quienes refieren estos mismos hallazgos en sus casos de neumonía intersticial.

Como consecuencia de la hiperplasia de los neumocitos tipo II, las paredes alveolares se vuelven cada vez más gruesas y esto contribuye a que los pulmones adquieran aspecto gomoso y no colapsen después de abrir la cavidad torácica. En este tipo de neumonía los principales patógenos asociados son los agentes virales; se podría pensar que la lesión es generalizada debido al tamaño de estos agentes, ya que logran pasar más allá de la primera porción del pulmón y por eso la distribución de daño tiende a extenderse (López y Martinson, 2017). Aunque en este tipo de neumonías se encontraron todas las bacterias de interés, *M. ruminalis* e *H. somni* se detectaron con mayor frecuencia. Hasta el momento se desconoce la patogenia de *M. ruminalis*. No obstante, Poulsen *et al.* (2006) demostraron que *M. ruminalis* produce  $\beta$  hemólisis, lo que indica que probablemente produce también alguna hemolisina. Aunque este precedente es sumamente relevante, la patogenia sigue siendo desconocida, por lo que se ignora la implicación que pueda tener esta bacteria en el desarrollo de la neumonía intersticial. Por otro lado, la patogenia de *H. somni* está relacionada con bronconeumonía y con otros procesos infecciosos como pleuritis, pericarditis, poliartritis y meningoencefalitis trombótica infecciosa (Caswell y Williams, 2016). Se desconoce su relación directa con la neumonía intersticial, pero existen varias causas tanto infecciosas como no infecciosas (tóxicos) que pueden provocar neumonía intersticial en los bovinos, siendo los agentes virales los más comunes en esta especie. Por tanto, es probable que dichos agentes hayan estado presentes en estos casos diagnosticados como neumonía intersticial y que hayan coexistido las bacterias antes mencionadas. Sin embargo, no hubo presencia de exudado supurativo por lo que la patogenia en este tipo de interacciones parece ser distinta.

Únicamente uno de los casos (el caso 33) presentó neumonía granulomatosa. Los hallazgos macroscópicos en éste fueron el parénquima pulmonar congestionado, consolidación lobular mixta y la presencia de múltiples nódulos blanco-amarillentos bien delimitados de consistencia firme distribuidos entre los lóbulos craneales y caudales. Murray *et al.* (2017) describieron 5 casos como “bronconeumonía caseonecrótica”, quizá refiriéndose a la necrosis caseosa que se presenta en granulomas; sin embargo, los autores refieren la presencia de abscesos y los definen como acumulación de exudado “licuado” quizá refiriéndose a necrosis licuefactiva. Debido a la diferencia de terminología, no hay seguridad de que se trate del mismo tipo de neumonía, por lo que los datos en este punto no son comparables en esta clasificación.

Como se mencionó anteriormente, sobre la superficie pulmonar del caso 33 hubo múltiples nódulos blancos amarillentos bien delimitados de consistencia firme, distribuidos entre los lóbulos craneales y caudales, en este caso se detectó a *M. bovis* la cual es capaz de producir nódulos con necrosis caseosa por el daño oxidativo que genera al expresar la NOX (Josi *et*

*al.*, 2019). A pesar de que a las bacterias de interés en este estudio no se les ha relacionado directamente con la formación de granulomas, estos no se podrían descartar como parte de la respuesta inmune al tratar de contener la infección. También debemos considerar otros agentes que ya han sido investigados y se sabe que son causantes de la neumonía granulomatosa, tales como *Mycobacterium tuberculosis* y *Aspergillus* spp (Pancieria y Confer, 2010).

Suwanruengsri *et al.* (2022) estudiaron la formación de granulomas asociada con la infección causada por *Mycoplasma bovis* en varios órganos de 21 bovinos negros japoneses, de los cuales 11 casos se confirmaron como neumonía granulomatosa. Ese fue el primer estudio que reporta la formación de granulomas provocados por una bacteria distinta a *Mycobacterium bovis*. En él describen 3 áreas distinguibles en los granulomas: un núcleo caseonecrotico con neutrófilos degenerados, numerosos macrófagos grandes que rodean este núcleo en el área media o interna y un área externa que consta de macrófagos mezclados con linfocitos, células plasmáticas y tejido fibroso. Estas características microscópicas coinciden con los hallazgos que nosotros reportamos en este trabajo. Estos hallazgos invitan a considerar a otros patógenos como posibles causales de neumonía granulomatosa.

En algunos reportes existe discrepancia entre los casos con granulomas y aquellos con reacción inflamatoria granulomatosa. En términos estrictos, López y Martinson (2017) mencionan que el sello distintivo de la neumonía granulomatosa es la respuesta inflamatoria que resulta en la formación de granulomas. Siguiendo este fundamento algunas veces solo engloban en esta clasificación los casos que presentan granulomas bien formados; no obstante, también se ha mencionado que los granulomas tienen un proceso de maduración por lo que no se podrían descartar aquellos casos en los que se observó inflamación granulomatosa, lo que puede ser un estadio temprano de la formación del granuloma. Esta premisa se respalda con el estudio de Shah *et al.*, (2017), quienes mencionan que la inflamación granulomatosa puede tener patrones de reacción comunes que incluyen granulomas necrotizantes, no necrotizantes, supurativos, inflamación granulomatosa generalizada y reacción de células gigantes a cuerpo extraño. Bajo estos conceptos, no suena ilógico englobar los otros casos que no tuvieron la formación del granuloma pero sí presentaron inflamación granulomatosa; sin embargo, queda mucho por investigar para poder clasificar con más certeza las lesiones de tipo granulomatosas en los pulmones de bovinos.

En la evaluación macroscópica de los 38 casos, se encontró que 16 casos presentaron más de un tipo de exudado, lesiones o infiltrado inflamatorio, dando así patrones clasificados como mixtos. Microscópicamente, se detectaron 10 casos con más de un proceso inflamatorio bien delimitado y 12 casos más con patrones de daño mixto, por ejemplo fibrinosupurativo y broncointersticial (Tabla 11). Esto puede deberse a la presencia de varios microorganismos involucrados en el proceso y a que la respuesta inmunológica contra estos es muy variada y

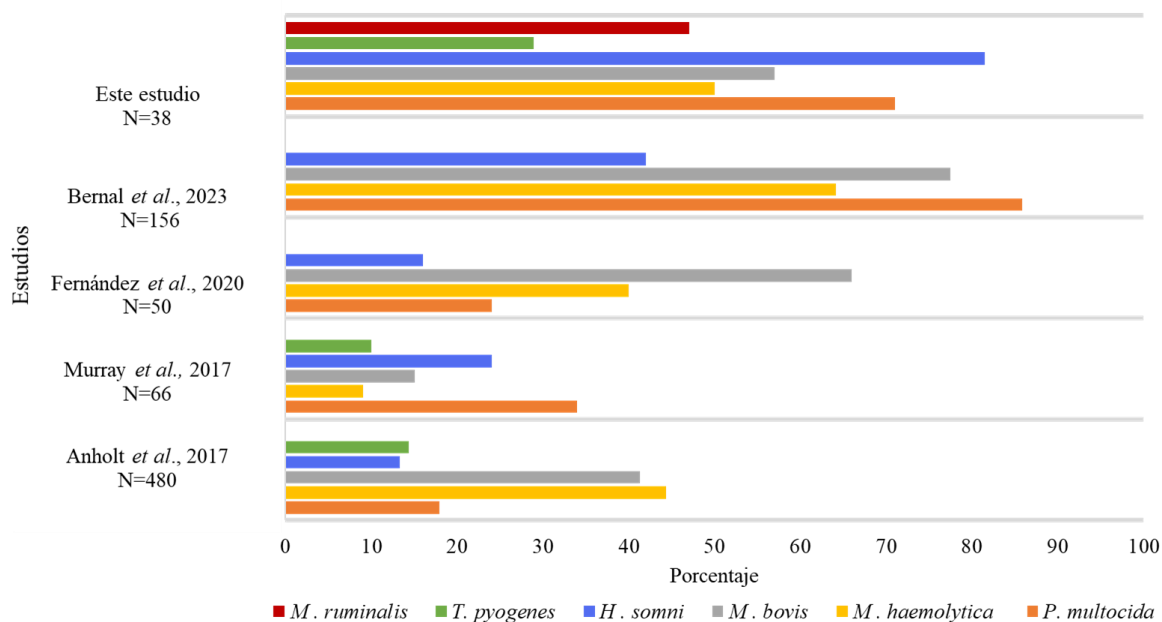
particular en cada individuo. Independientemente de la cantidad de géneros bacterianos detectados, todos los casos presentaron puntuaciones iguales o superiores a los 10 puntos cuando la máxima era 15, siendo el alvéolo la estructura más afectada en todos los casos. El daño fue muy severo en todos los casos y no encontramos una asociación en particular de daño/ bacteria/cantidad de bacterias; este dato nos muestra lo patógenas que pueden ser estas bacterias en el parénquima pulmonar por sí solas o actuando en sinergia.

Se cree que las neumonías inician por infección viral y se complican con la presencia de bacterias oportunistas, sin embargo no siempre es así. Existen estudios *in vivo* sobre coinfecciones virales y bacterianas donde se demuestra que una infección viral primaria también podría aumentar la patogenicidad de una infección viral secundaria y, de manera similar, las infecciones duales con dos patógenos bacterianos podrían aumentar la gravedad de las lesiones neumónicas sin que haya un agente viral primario (Gaudino *et al.*, 2020). Por tanto, es importante no generalizar estos procesos inflamatorios del pulmón, suponiendo siempre la llegada inicial de un agente viral.

La especie bacteriana que se identificó con mayor frecuencia fue *H. somni*, encontrada en 31 casos, seguida de *P. multocida* presente en 27 casos, *M. bovis* en 22 casos, *M. ruminalis* en 20 casos, *M. haemolytica* en 17 casos y *T. pyogenes* en 11 casos. *T. pyogenes* también estuvo presente en todas las clasificaciones pero no fue la más común en ninguna de ellas. A este patógeno se le conoce como patógeno secundario oportunista usualmente encontrado en procesos de bronconeumonía crónica (Caswell y Williams, 2016). Entre los factores de virulencia de *T. pyogenes* se incluyen una exotoxina con actividad hemolítica llamada piolisina (PLO) (Rzewuska *et al.*, 2019). PLO es el factor de virulencia más importante de esta bacteria ya que es capaz de generar poros transmembranales en las células del hospedador, lo que genera la lisis celular; además tiene efecto citotóxico sobre los neutrófilos, macrófagos, células epiteliales y eritrocitos. Tras su colonización se puede observar exudado supurativo y también se podrían encontrar daños vasculares debido a su acción sobre el endotelio vascular (Caswell y Williams, 2016; Rzewuska *et al.*, 2019).

Existen diversos estudios que reportan las especies bacterianas encontradas en bovinos que cursaron con procesos neumónicos. A diferencia de este estudio, en ellos no se reportan los diagnósticos morfológicos, excepto en el trabajo de Murray *et al.* (2017), quienes reportaron a *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* en los casos de bronconeumonía supurativa y fibrinosa, mientras que en casos de neumonía intersticial encontraron a *M. haemolytica* e *H. somni*. Realizamos una comparación de estos estudios para comparar las bacterias identificadas en cada uno (Figura 40). Todos los valores se expresan en porcentaje para comparar los datos, ya que en todos los estudios el tamaño de muestra fue diferente. En dos estudios (Murray *et al.*, 2017 y Fernández *et al.*, 2020) *P. multocida* fue la bacteria aislada con mayor frecuencia, a diferencia de nuestro estudio que fue la segunda después de *H. somni*. Al igual que Murray *et al.* (2017), la tercera bacteria más detectada fue *M. bovis*.

Independientemente de la cantidad de veces encontradas, en todos los estudios se puede apreciar que la tendencia entre las bacterias de interés no es tan distinta a pesar de la zona geográfica de estudio. Se tiene en común con estos estudios la edad de los animales, los cuales no superan los 6 meses de vida.



**Figura 33. Comparación de bacterias detectadas en diferentes estudios sobre neumonías en bovinos.**

Como se mencionó anteriormente, *M. haemolytica*, *H. somni*, *P. multocida* y *M. bovis* pueden formar parte de la microbiota del tracto respiratorio superior del bovino (Holman *et al.*, 2015; Anholt *et al.*, 2017; Amat *et al.*, 2019), por lo que se entiende que estas sean las que están mayormente implicadas en los procesos neumónicos participando como agentes oportunistas en mayor o menor medida. Se sabe que los terneros estresados tienen una mayor densidad de estas bacterias en el tracto respiratorio superior; las bacterias se inhalan a través de gotas que llegan a los pulmones y luego pueden adherirse a la superficie epitelial y colonizarla, desencadenando así los procesos neumónicos (Griffin *et al.*, 2010).

Anholt *et al.* (2017) diagnosticaron 480 casos de neumonías a partir de cultivos bacterianos de muestras de pulmón, en los cuales se encontró a *M. bovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somni* y *T. pyogenes*. La presencia de las 4 primeras fue confirmada mediante desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (Maldi-Tof); la bacteria que aislaron con más frecuencia fue *M. haemolytica* con 213 casos positivos, seguida de *M. bovis* con 198 casos, *P. multocida* con 86 casos, *H. somni* con 64 casos y *T. pyogenes* con 69 casos.

*T. pyogenes* solo fue reportada en dos estudios (Anholt *et al.*, 2017 y Murray *et al.*, 2017) con una incidencia del 14.3 % (69 casos) y del 10% (10 casos de 66), respectivamente. En el pulmón, este microorganismo es un invasor secundario que generalmente sólo establece la infección luego de la supresión de los mecanismos de defensa físicos, celulares o secretores del hospedero (Peek *et al.*, 2018). A pesar de que no se le considere como patógeno principal de los procesos neumónicos, cada vez se aísla con mayor frecuencia y se debe dar más visibilidad ya que se ha demostrado su presencia en los reportes ya mencionados.

Por otro lado, Algammal *et al.* (2020) realizaron un estudio en Egipto. De 170 terneros con signos clínicos de neumonía aislaron a *Escherichia coli* (*E. coli*) en el 23.5% de sus casos, *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*) en 12.4%, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en 11.8%, *P. multocida* en 1.8% y *M. haemolytica* en 0.6%. En este caso las muestras provenían de hisopados nasales que posteriormente fueron cultivados; se realizó PCR únicamente para las 3 primeras especies mencionadas. A pesar de estas diferencias en metodología y ubicación, estos resultados son un precedente para considerar a más bacterias que pueden estar involucradas en los procesos neumónicos en bovinos.

En nuestro estudio, 32 de 38 casos presentaron más de dos géneros bacterianos; el 42% (16 casos) presentó 4 géneros bacterianas, 34.2% (13 casos) 3 género, 10.5% (4 casos) 2 géneros, 7.8% (3 casos) 5 géneros y el 5.2% restante (2 casos) presentó solo un género bacteriano. No se encontraron asociaciones claras entre las bacterias aisladas; se detectó con mayor frecuencia a *H. somni* junto con *P. multocida*, sin embargo, estos patógenos también se encontraron con *M. bovis*, *M. haemolytica* y *T. pyogenes*. Similar a nuestros resultados Murray *et al.* (2017) mencionan que la asociación más común en su estudio fue *H. somni* y *M. haemolytica*, pero también se encontraron a estas bacterias con *P. multocida* o con *M. bovis*. Fernández *et al.* (2020) mencionan que en 24 casos de 50, hubo coinfecciones con más de una especie bacteriana, aunque no mencionan cuáles pero también sostienen la idea de que diversos microorganismos pueden coexistir en la misma infección.

Como se mencionó anteriormente, algunas de las bacterias de interés son parte de distintos nichos del aparato respiratorio bovino en un estado de salud sano, por lo que el desarrollo de un proceso neumónico dependerá de la carga bacteriana y otros factores que predisponen al hospedero, tales como estrés por transporte, destete precoz, infección viral previa, interacción con bovinos provenientes de diferentes regiones, etc. Sin embargo, no siempre requieren la ayuda de factores estresantes ambientales, de manejo u otros agentes infecciosos para que sean capaces de producir neumonía (Peek *et al.*, 2018). Debido a las evidencias de más de un patógeno implicado en las neumonías en bovinos, a éstas también se les reconoce como enfermedades polimicrobianas y por tanto, el margen de bacterias asociadas a cada clasificación de las ya mencionadas se amplía (Gaudino *et al.*, 2022).

Uno de los hallazgos más relevantes en nuestro estudio fue la alta incidencia de *H. somni* y la detección de *M. ruminalis* en 20 casos. Este sería el primer reporte que relacione a *M.*

*ruminalis* con neumonías en bovinos. Este hallazgo es novedoso ya que demuestra que otras especies bacterianas también pueden estar relacionadas con las neumonías en bovinos, pero quizá se encuentran subdetectadas y aunque se hallen, no se ha estudiado qué tanta influencia pueden estar teniendo en el desarrollo de enfermedades, sobre todo si hay otras bacterias implicadas también en el proceso, que puedan enmascarar el efecto de estas otras especies. Estos resultados cuestionan el concepto que hay sobre la relación entre el tipo de neumonía y las bacterias involucradas en su desarrollo.

El primer reporte de *M. ruminalis* fue por Angen *et al.* (1999) quienes la aislaron del rumen de bovinos y ovinos y la describieron como bacteria no patógena. En otro estudio realizado por Poulsen *et al.* (2006) en Noruega, se analizaron hisopados nasales de ovinos sanos y encontraron a *M. ruminalis*. Así mismo, se ha reportado la presencia de esta bacteria en casos de mastitis aguda en ovejas (Omaleki *et al.*, 2010) y en casos de periodontitis ovina (Riggio *et al.*, 2013). Estos antecedentes refuerzan el hecho de que esta bacteria puede estar relacionada con diversas enfermedades. Existen varios estudios que confirman la presencia de *M. ruminalis* tanto en animales sanos como asociada a alguna enfermedad. En nuestro estudio, suponemos que la bacteria se pudo translocar del sistema digestivo al sistema respiratorio y pudo formar parte de las bacterias oportunistas que desarrollan procesos neumónicos. No se puede saber a ciencia cierta esta afirmación, sobre todo por el antecedente de Guenther *et al.* (2008), quienes la aislaron de pulmón de bovino sano; sin embargo, este hallazgo nos invita a seguir realizando más experimentos para comprender mejor la presencia de esta bacteria y su implicación en los procesos neumónicos de los bovinos.

## 9. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que no existe exclusividad entre la bacteria identificada y el tipo de neumonía, ya que se demostró que *M. haemolytica*, *M. ruminalis*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. bovis* y *T. pyogenes* pueden estar involucrados en el desarrollo de bronconeumonía, neumonía intersticial y granulomatosa y pueden encontrarse coexistiendo en el mismo caso, lo que da como resultado patrones de daño mixtos, tanto macroscópicos como microscópicos.

Este es el primer estudio que reporta a *M. ruminalis* asociada a neumonías en bovinos. Es importante considerar que puede haber otros patógenos implicados en los procesos neumónicos, los cuales pueden estar subdiagnosticados por las asociaciones que comúnmente se hacen con respecto a lesión/agente involucrado. Se deben realizar más análisis para poder comprender mejor la participación de *M. ruminalis* en los procesos neumónicos del bovino.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulmawjood, A., Wickhorst, J., Hashim, O., Sammra, O., Hassan, A. A., Alssahen, M., Klein, G. Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for molecular identification of *Trueperella pyogenes* isolated from various origins. *Molecular and Cellular Probes* 2016;30(4): 205-210.
- Ackermann, M.R., Derscheid, R., Roth, J.A. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2010;26(2):215-228.
- Alexander, T. W., Cook, S. R., Yanke, L. J., Booker, C. W., Morley, P. S., Read, R. R., McAllister, T. A. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. *Veterinary Microbiology* 2008;130(1-2):165–175.
- Algammal, A. M., El-Sayed, M. E., Youssef, F. M., Saad, S. A., Elhaig, M. M., Batiha, G. E., Ghobashy, M. O. Prevalence, the antibiogram and the frequency of virulence genes of the most predominant bacterial pathogens incriminated in calf pneumonia. *AMB Express* 2020;10(1):1-8.
- Amat, S., Holman, D. B., Timsit, E., Schwinghamer, T., Alexander, T. W. Evaluation of the nasopharyngeal microbiota in beef cattle transported to a feedlot, with a focus on lactic acid-producing bacteria. *Frontiers in microbiology* 2019;10:1988.
- Angen, Ø., Quirie, M., Donachie, W., Bisgaard, M. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Veterinary Microbiology* 1999;65(4):283-290.
- Anholt, R. M., Klima, C., Allan, N., Matheson-Bird, H., Schatz, C., Ajitkumar, P., Ralston, B. Antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex in Alberta, Canadá. *Frontiers in Veterinary Science* 2017;4:207.
- Arcangioli, M. A., Duet, A., Meyer, G., Dernburg, A., Bézille, P., Poumarat, F., Le Grand, D. The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *The veterinary journal* 2008;177(1):89-93.
- Aski, H. S., Tabatabaei, M. Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts. *Microbial pathogenesis* 2016;96:52-57.
- Becker, C. A., Ambroset, C., Huleux, A., Vialatte, A., Colin, A., Tricot, A., Tardy, F. Monitoring *Mycoplasma bovis* diversity and antimicrobial susceptibility in calf feedlots undergoing a respiratory disease outbreak. *Pathogens* 2020;9(7):593.
- Budras, K. D., Druckerei, S. V., Habel, R. E., Wünsche, A., Jahrmärker, G. Thoracic cavity. En Budras, K. D., Habel, R. E., ed. *Bovine Anatomy an Illustrated Text*, 1ª. Hanover, Germany: Schulutersche; 2004. p.62-64.
- Cai, Y., Varasteh, S., van Putten, J. P., Folkerts, G., Braber, S. *Mannheimia haemolytica* and lipopolysaccharide induce airway epithelial inflammatory responses in an extensively developed ex vivo calf model. *Scientific Reports* 2020;10(1):1-14.

- Calderón, B.J. M., Fernández, A., Arnal, J. L., Sanz, T., C., Fernández, J. F., Vela, A. I., Cid, D. Molecular Epidemiology of *Pasteurella multocida* Associated with Bovine Respiratory Disease Outbreaks. *Animals* 2022;13(1):75.
- Caswell, J. L., Bateman, K. G., Cai, H. Y., Castillo-Alcala, F. *Mycoplasma bovis* in respiratory disease of feedlot cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2010;26(2):365-379.
- Caswell, J. L., Williams, K. J. Respiratory System. En: Grant M. M., ed. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 6<sup>a</sup>. Missouri: Elsevier; 2016. p.456-591.
- Choudhary, M., Choudhary, B.K., Chandra, Ghosh, R., Bhojar, S., Chaudhari S, Barbuddhe SB. Cultivable microbiota and pulmonary lesions in polymicrobial bovine pneumonia. *Microbial Pathogenesis* 2019;134:103577.
- Cozens, D., Sutherland, E., Lauder, M., Taylor, G., Berry, C. C., Davies, R. L. Pathogenic *Mannheimia haemolytica* invades differentiated bovine airway epithelial cells. *Infection and immunity* 2019;87(6):78-19.
- Dabo, S. M., Taylor, J. D., Confer, A. W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews* 2007; 8(2):129-150.
- Dawood, A., Algharib, S. A., Zhao, G., Zhu, T., Qi, M., Delai, K., Guo, A. Mycoplasmas as host pantropic and specific pathogens: clinical implications, gene transfer, virulence factors, and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022;12:855731.
- De la Rosa Romero, J. L., Jaramillo, C. J., Martínez, J. J., Aguilar, F., Hernández, C.R., Suárez, G. F., Tavera, F. T. Frequency of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates obtained from calves with clinical signs of respiratory tract disease from a dairy complex in the state of Hidalgo, Mexico. *Veterinaria México* 2012;43(1):1-8.
- Delano, M. L., Scott, A. M., Underwood, W. J. Biology and Diseases of Ruminants: Sheep, Goats, and Cattle. En: James, G. F., Lynn, C. A., Mark, T.W., ed. *Laboratory Animal Medicine*, 2<sup>a</sup>. Massachusetts: Academic press; 2002. p.623-694.
- Deshpande, M. S., Ambagala, T. C., Ambagala, A. P. N., Kehrli Jr, M. E., Srikumaran, S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infection and Immunity* 2002;70(9):5058-5064.
- Ewers, C., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Kiebling, S., Filter, M., Wieler, L. H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary microbiology* 2006;114(3-4):304-317.
- Fernández, M., Ferreras, M. D. C., Giráldez, F. J., Benavides, J., Pérez, V. Production significance of bovine respiratory disease lesions in slaughtered beef cattle. *Animals* 2020;10(10):1770.
- Figuroa, V.C., Montes, G.J. F., Vázquez, C. C., Zenteno, E., Pereyra, M. A., Negrete-Abascal, E. *Mannheimia haemolytica* OmpH binds fibrinogen and fibronectin and participates in biofilm formation. *Microbial Pathogenesis* 2022;172:105788.



- Francoz, D., Fortin, M., Fecteau, G. and Messier, S. Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Veterinary Microbiology* 2005;105:57-64.
- Gaudino, M., Nagamine, B., Ducatez, M. F., Meyer, G. Understanding the mechanisms of viral and bacterial coinfections in bovine respiratory disease: a comprehensive literature review of experimental evidence. *Veterinary research* 2020; 53(1):1-25.
- Gorden, P.J., Plummer, P. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. *Veterinary Clinics of North America* 2010;26(2):243-259.
- Griffin, D., Chengappa, M. M., Kuszak, J., McVey, D. S. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2010; 26(2):381-394.
- Guan, L., Xue, Y., Ding, W., Zhao, Z. Biosynthesis and regulation mechanisms of the *Pasteurella multocida* capsule. *Research in veterinary science* 2019;127:82-90.
- Guenther, S., Schierack, P., Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Wieler, L. H., Ewers, C. Real-time PCR assay for the detection of species of the genus Mannheimia. *Journal of microbiological methods* 2008;75(1):75-80.
- Guo, T., Zhang, J., Chen, X., Wei, X., Wu, C., Cui, Q., Hao, Y. Investigation of viral pathogens in cattle with bovine respiratory disease complex in Inner Mongolia, China. *Microbial Pathogenesis*.2021;153:104594.
- Harkema, J.R., Carey, S.A., Wagner, J.G. Nasal Airways. En: McQueen, A.L., ed. *Comprehensive Toxicology*, 2<sup>a</sup>. Auburn: Elsevier; 2010. p.13-34.
- Harper, M., Boyce, D.J., Adler, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis:125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters* 2006;265(1):1-10.
- Hatfaludi, T., Al-Hasani, K., Boyce, J. D., Adler, B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary microbiology* 2010;144(2):1-17.
- Hay, K. E., Morton, J. M., Clements, A. C. A., Mahony, T. J., Barnes, T. S. Population-level effects of risk factors for bovine respiratory disease in Australian feedlot cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 2017;140:78-86.
- Hellenbrand, K. M., Forsythe, K. M., Rivera-Rivas, J. J., Czuprynski, C. J., Aulik, N. A. *Histophilus somni* causes extracellular trap formation by bovine neutrophils and macrophages. *Microbial pathogenesis* 2013;54:67-75.
- Hijazin, M., Ülbegi-Mohyla, H., Alber, J., Lämmle, C., Hassan, A. A., Abdulmawjood, A., Zschöck, M. Molecular identification and further characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine mastitis and from various other origins. *Journal of dairy Science* 2011;94(4):1813-1819.
- Holman, D.B., Timsit, E., Alexander, T.W. The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle. *Scientific reports* 2015;5(1):15557.

Horwood, P.F., Schibrowski, M.I., Fowler, E.V., Gibson, J.S., Barnes, T.S., Mahony, T.J. Is *Mycoplasma bovis* a missing component of the bovine respiratory disease complex in Australia? *Australian Veterinary Journal* 2014;92(6):185-191.

Jain, V., Vashisht, R., Yilmaz, G., Bhardwaj, A. Pneumonia Pathology. [Internet]. Treasure Island StatPearls. 2022. Disponible en: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk526116>

Jaramillo, A. C. J., Hernández, C. R., Campuzano, O. V. M., Delgado, S. G., Morales, E. R., Xicohtencatl, C. J., Trigo, T. F. Ribotyping of isolates of *Mannheimia haemolytica* serotype 1 obtained from nasal exudate of dairy cattle in México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 2017;8(2):19-224.

Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., Maheswaran, S. K. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Animal Health Research Reviews* 2002;3(2):69-82.

Josi, C., Bürki, S., Vidal, S., Dordet-Frisoni, E., Citti, C., Falquet, L., Pilo, P. Large-scale analysis of the *Mycoplasma bovis* genome identified non-essential, adhesion-and virulence-related genes. *Frontiers in microbiology* 2019;10:2085.

Kisiela, D. I., Czuprynski, C. J. Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. *Infection and immunity* 2009;7(1):446-455.

Klima, C. L., Alexander, T. W., Hendrick, S., McAllister, T. A. Characterization of *Mannheimia haemolytica* isolated from feedlot cattle that were healthy or treated for bovine respiratory disease. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2014;78(1):38-45.

Klima, C. L., Holman, D. B., Cook, S. R., Conrad, C. C., Ralston, B. J., Allan, N., McAllister, T. A. Multidrug resistance in *Pasteurellaceae* associated with bovine respiratory disease mortalities in North America from 2011 to 2016. *Frontiers in Microbiology* 2020;11:606438.

König, H. E., Liebich, H.G. Respiratory system (apparatus respiratorius). En: König, H. E., Liebich, H.G., ed. *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas*, 3<sup>a</sup>. Illinois: Schattauer; 2004. p. 343-364.

Kuckleburg, C.J., McClenahan, D.J., Czuprynski, C.J. Platelet activation by *Histophilus somni* and its LOS induces endothelial cell pro-inflammatory responses and platelet internalization. *Shock* 2008; 29(2):189-196.

Kumar, R., Ali, S.A., Singh, S.K., Bhushan, V., Mathur, M., Jamwal, S., Mohanty, A.K., Kaushik, J.K., Kumar, S. Antimicrobial peptides in farm animals: An updated review on its diversity, function, modes of action and therapeutic prospects. *Veterinary Sciences* 2020;7(4):206-234.

Kurčić, V., Doković, R., Ilić, Z., Petrović, M. Etiopathogenesis and economic significance of bovine respiratory disease complex (BRDC). *Acta Agriculturae Serbica* 2018;23(45):85-100.

Lam, H. J., Derkman, T. H. J., Van, G.E., Dijkman, R., Van, E.E. Distinct *Mannheimia haemolytica* serotypes isolated from fatal infections in veal calves and dairy cows. *The Veterinary Journal* 2023;292:105940.

Liu, D., Lawrence, M. L., Austin, F. W. Specific PCR identification of *Pasteurella multocida* based on putative transcriptional regulator genes. *Journal of Microbiological Methods* 2004;58(2):263-267.

- López, M.A., Martinson, S.A. Respiratory system, mediastinum, and pleurae. En: Zachary, J.F. *Pathologic basis of veterinary disease*, 6ª. St. Louis, Misuri: Elsevier; 2017. p.471-560.
- Mahu, M., Valgaeren, B., Pardon, B., Deprez, P., Haesebrouck, F., Boyen, F. Non-haemolytic *Mannheimia haemolytica* as a cause of pleuropneumonia and septicemia in a calf. *Veterinary Microbiology* 2015;180(2):157-160.
- Maunsell, F. P., Donovan, G. A. *Mycoplasma bovis* infections in young calves. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 2009;25(1):139-177.
- McMullen, C., Alexander, T.W., Léguillette, R. Topography of the respiratory tract bacterial microbiota in cattle. *Microbiome* 2020;8:911-915.
- Mescher, A.L. The Respiratory System. En: Mescher, A.L., ed. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 14ª. Indiana: Mcgraw Hill Edducation; 2011. p.349-364.
- Miller, L.M., Gal, A. Cardiovascular System and Lymphatic Vessels. En: Zachary, J.F., ed. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6ª. Illinois: Elsevier; 2017. p.561-616.
- Moreno, L. Z., Matajira, C. E., da Costa, B. L., Ferreira, T. S., Silva, G. F., Dutra, M. C., Moreno, A. M. Characterization of porcine *Trueperella pyogenes* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), molecular typing and antimicrobial susceptibility profiling in Sao Paulo State. *Comparative immunology, microbiology and infectious Diseases* 2017;51:49-53.
- Murillo López de Silanes, MD. Sistema respiratorio. En: García Sacristan, A., ed. *Fisiología veterinaria*, 2ª. Madrid: Tébar Flores; 2018. p.383-418.
- Murray, G. M., More, S. J., Sammin, D., Casey, M. J., McElroy, M. C., O'Neill, R. G., Cassidy, J. P. Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2017;29(1):20-34.
- Nunoya, T., Omori, T., Tomioka, H., Umeda, F., Suzuki, T., Uetsuka, K. Intracellular localization of *Mycoplasma bovis* in the bronchiolar epithelium of experimentally infected calves. *Journal of comparative pathology* 2020;176:14-18.
- O'Boyle, N., Berry, C. C., Davies, R. L. Differentiated ovine tracheal epithelial cells support the colonisation of pathogenic and non-pathogenic strains of *Mannheimia haemolytica*. *Scientific Reports* 2020;10(1):1-11.
- Omaleki, L., Barber, S. R., Allen, J. L., Browning, G. F. *Mannheimia* species associated with ovine mastitis. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48(9):3419-3422.
- Oppermann, T., Busse, N., Czermak, P. *Mannheimia haemolytica* growth and leukotoxin production for vaccine manufacturing—A bioprocess review. *Electronic Journal of Biotechnology* 2017;(28): 95-100.
- Orellana Meneses, G. A. Evolución etimológica y análisis de la definición de las neumonías recurrentes en niños. *Gaceta Médica* 2015;17(1):102-110.

- Pancieria, R. J., Confer, A. W. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2010;26(2):191-214.
- Parker, A. M., Shukla, A., House, J. K., Hazelton, M. S., Bosward, K. L., Kokotovic, B., Sheehy, P. A. Genetic characterization of Australian *Mycoplasma bovis* isolates through whole genome sequencing analysis. *Veterinary microbiology* 2016;196:118-125.
- Peek, S. F., Ollivett, T. L., Divers, T. J. Respiratory Diseases. En: Peek, F. P., Divers, T. J., ed. *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 4<sup>a</sup>. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018. p.94-167.
- Peng, Z., Wang, X., Zhou, R., Chen, H., Wilson, B. A., Wu, B. *Pasteurella multocida*: genotypes and genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2019;83(4):00014-19.
- Pijoan, A. P., Aguilar, R. F., Morales, A, J. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana Baja California, México. *Veterinaria México* 1999;30(2):149-155.
- Poulsen, L. L., Reinert, T. M., Sand, R. L., Bisgaard, M., Christensen, H., Olsen, J. E., Bojesen, A. M. Occurrence of *Mannheimia haemolytic* spp. in apparently healthy sheep in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2006;48(1):1-7.
- Prohl, A., Ostermann, C., Lohr, M., Reinhold, P. The bovine lung in biomedical research: visually guided bronchoscopy, intrabronchial inoculation and in vivo sampling techniques. *Journal of Visualized Experiments* 2014;89:51557.
- Qiao, Q., Liu, X., Yang, T., Cui, K., Kong, L., Yang, C., Zhang, Z. Nanomedicine for acute respiratory distress syndrome: The latest application, targeting strategy, and rational design. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2021;11(10):3060-3091.
- Rice, J. A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D. C., Shewen, P. E. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews* 2007;8(2):117-128.
- Riggio, M. P., Jonsson, N., Bennett, D. Culture-independent identification of bacteria associated with ovine 'broken mouth' periodontitis. *Veterinary microbiology* 2013;166(3-4): 664-669.
- Risetti, R. M., Zastempowska, E., Twarużek, M., Lassa, H., Pantoja, J. C. F., De Vargas, A. P. C., Ribeiro, M. G. Virulence markers associated with *Trueperella pyogenes* infections in livestock and companion animals. *Letters in Applied Microbiology* 2017;65(2):125-132.
- Rodríguez, J. L., Valencia, G. L., Navarro, F. J. M., Basulto, G. E. M., Hori-oshima, S., Cueto, S. A., Rentería, T. B. Detection and economic impact related to bovine respiratory disease, shrink, and traveling distance in feedlot cattle in northwest México. *Turkish journal of veterinary & animal Sciences* 2017;41(2):294-301.
- Rogovskyy, A. S., Lawhon, S., Kuczanski, K., Gillis, D. C., Wu, J., Hurley, H., Duncan, K. Phenotypic and genotypic characteristics of *Trueperella pyogenes* isolated from ruminants. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2018;30(3); 348-353.
- Rzewuska, M., Kwiecień, E., Chrobak-Chmiel, D., Kizerwetter-Świda, M., Stefańska, I., Gieryńska, M. Pathogenicity and virulence of *Trueperella pyogenes*: a review. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(11):2737.

- Santos, R.M., Woolums, A., Thoresen, M., Blair, E., Jefferson, V., Meyer, F., Vance, C. K. Profiling *Mannheimia haemolytica* infection in dairy calves using near infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate analysis (MVA). *Scientific Reports* 2021;11(1):1-13.
- Sattar, S., Sharma, S. Bacterial Pneumonia. [Internet]. Treasure Island: StatPearls. 2022. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020693/>.
- Saunders, V. F., Reddacliff, L. A., Berg, T., Hornitzky, M. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Australian Veterinary Journal* 2007; 85(1-2):72-77.
- Schott, C., Cai, H., Parker, L., Bateman, K. G., Caswell, J. L. Hydrogen Peroxide Production and Free Radical-mediated Cell Stress in *Mycoplasma bovis* Pneumonia. *Journal of Comparative Pathology* 2014;150(2-3):127-137.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Escenario mensual de productos agroalimentarios, Dirección de Análisis Estratégico. 2022.
- Shah, K. K., Pritt, B. S., Alexander, M. P. Histopathologic review of granulomatous inflammation. *Journal of clinical tuberculosis and other Mycobacterial Diseases* 2017;7:1-12.
- Shirbroun, R. M. *Histophilus somni*: Antigenic and Genomic Changes Relevant to Bovine Respiratory Disease. *Veterinary Clinics Food Animal Practice* 2020;36(2):279-295.
- Shirzad, A.K., Tabatabaei, M. Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts. *Microbial pathogenesis* 2016;96:52-57.
- Siddaramppa, S., Inzana, T. J. *Haemophilus somnus* virulence factors and resistance to host immunity. *Animal Health Research Reviews* 2004;5(1):79-93.
- Silva, E., Gaivão, M., Leitão, S., Jost, B. H., Carneiro, C., Vilela, C. L., Mateus, L. Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Veterinary Microbiology* 2008;132(1-2):111-118.
- Singh, K., Ritchey, J. W., Confer, A. W. *Mannheimia haemolytica*: bacterial–host interactions in bovine pneumonia. *Veterinary Pathology* 2011;48(2):338-348.
- Snyder, E., Credille, B. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in bovine respiratory disease: how are they changing in response to efforts to control them? *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2020;36(2):253-268.
- Stokka, G.L. Prevention of respiratory disease in cow/calf operations. *Veterinary Clinics of North America* 2010;26(2):229-241.
- Su, A., Tong, J., Fu, Y., Müller, S., Weldearegay, Y. B., Becher, P., Herrler, G. Infection of bovine well-differentiated airway epithelial cells by *Pasteurella multocida*: actions and counteractions in the bacteria–host interactions. *Veterinary Research* 2020;51(1):1-11.
- Suwanruengsri, M., Uemura, R., Kanda, Ted., Fuke, N., Nueangphuet, P., Pornthummawat, A., Yamaguchi, R. Production of granulomas in *Mycoplasma bovis* infection associated with meningitis-

meningoencephalitis, endocarditis, and pneumonia in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2022;34(1):68-76.

Sykes, J. E. *Mycoplasma* infections. *Canine and Feline Infectious Diseases*. 1<sup>a</sup>. Missouri. Elsevier Health Sciences. 2013.

Tagawa, Y., Haritani, M., Ishikawa, H., Yuasa, N. Characterization of a heat-modifiable outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity* 1993;61(5):1750-1755.

Tamai, I. A., Mohammadzadeh, A., Salehi, T. Z., Mahmoodi, P., Pakbin, B. Expression of virulence factor genes in co-infections with *Trueperella pyogenes* isolates and other bacterial pathogens; an-in-vivo study. *Microbial Pathogenesis* 2022;164:105435.

Torres, A., Cilloniz, C., Niederman, MS. Pneumonia. *Nature Reviews Disease Primers* 2021;7(25).

Townsend, K. M., Boyce, J. D., Chung, J. Y., Frost, A. J., Adler, B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39(3):924-929.

Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Gorla, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Rosati, S. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011;23(4):657-664.

Trigo Tavera, F. J. Aparato respiratorio. En: Trigo Tavera, F. J., Romero Romero L., ed. *Patología Sistémica Veterinaria*, 6<sup>a</sup>. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017. p.47:96.

Urumova, V., Lyutskanov, M., Tsachev, I., Marutsov, P., Zhelev, G. Investigations on the involvement of *Arcanobacterium pyogenes* in various infections in productive and companion animals and sensitivity of isolates to antibacterials. *Revue de Medecine Veterinaire* 2009;160(12): 582-585.

Villagómez, C. J. A., Martínez, H. D. I. Epidemiological evaluation of clinical bovine respiratory disease complex in a tropical Mexican feedlot. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences* 2013;3(9):315-321.

Weinberger, S. E., Cockrill, B. A., Mandel, J. Lung defense mechanisms. En: Weinberger, S. E., Cockrill, B. A., Mandel, J. *Principles of Pulmonary Medicine*, 6<sup>a</sup>. Massachusetts: Elsevier; 2014. p.285-296.

Xu, Q. Y., Pan, Q., Wu, Q., Xin, J. Q. *Mycoplasma bovis* adhesins and their target proteins. *Frontiers in Immunology* 2022;13:1016641.

Zekarias, B., Mattoo, S., Worby, C., Lehmann, J., Rosenbusch, R. F., Corbeil, L. B. *Histophilus somni* IbpA DR2/Fic in virulence and immunoprotection at the natural host alveolar epithelial barrier. *Infection and Immunity* 2010;78(5):1850-1858.

Zhang, W., Meng, X., Wang, J. Sensitive and rapid detection of *Trueperella pyogenes* using loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Microbiological Methods* 2013;93(2):124-126.

Zhao, G., Zhang, H., Chen, X., Zhu, X., Guo, Y., He, C., Guo, A. *Mycoplasma bovis* NADH oxidase functions as both a NADH oxidizing and O<sub>2</sub> reducing enzyme and an adhesin. *Scientific Reports* 2017;7(1):44.

Zhao, K. L., Liu, Y., Zhang, X. Y., Palahati, P. E., Wang, H. N., Yue, B. S. Detection and characterization of antibiotic-resistance genes in *Arcanobacterium pyogenes* strains from abscesses of forest musk deer. *Journal of Medical Microbiology* 2011;60(12):1820-1826.