

Aislamiento e Identificación Bioquímica de Cepas de *Pasteurella multocida* y *Gallibacterium anatis* en Aves de Producción con Signos Respiratorios

ISOLATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* AND *GALLIBACTERIUM ANATIS* STRAINS IN POULTRY WITH RESPIRATORY SIGNS

Gonzalo Castillo^{1,3}, Ysabel Koga^{1,4}, Arnaldo Alvarado^{1,2}, Robert Tinoco¹, Daniel Fernández¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar las biovariedades de *Pasteurella multocida* y *Gallibacterium anatis* en aves de producción con signos respiratorios. Estas bacterias fueron aisladas de muestras de secreciones y órganos de pollos de carne, gallinas de postura y patos criollos afectados, provenientes de granjas avícolas de la costa y selva del Perú. De 25 aislamientos se identificaron 13 cepas de *P. multocida* y 12 de *G. anatis*, mediante características de cultivo, morfología y pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, indol, ureasa). Las cepas fueron sometidas a la prueba de fermentación en micropozos, consistente en una batería de 10 carbohidratos y un aminoácido para su tipificación. Los resultados indican que ocho cepas de *P. multocida* correspondieron a la biovariedad 1 y las restantes a las biovariedades 3, 4, 6, 10 y 11, en tanto que 11 cepas de *G. anatis* correspondieron a la biovariedad *haemolytica* y la otra a la biovariedad *anatis*.

Palabras clave: pollos de carne, gallinas, patos, fermentación microbiana, síndrome respiratorio aviar

ABSTRACT

The aim of the study was to identify biovars of *Pasteurella multocida* and *Gallibacterium anatis* in poultry with respiratory signs. These bacteria were isolated from samples of secretions and organs of affected broilers, layers and ducks from various poultry farms in the coast and the tropics of Peru. Out of 25 isolates obtained, 13 strains

¹ Bioservice SRL, Lima

² Laboratorio de Patología Clínica y Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Carrera Profesional de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Alas Peruanas, Lima, Perú

⁴ E-mail: ysabelkogay@gmail.com

Recibido: 10 de diciembre de 2013

Aceptado para publicación: 18 de junio de 2014

of *P. multocida* and 12 of *G. anatis* were identified based on culture characteristics, morphology and biochemical tests (oxidase, catalase, indole, urease). These strains were subjected to micro-well fermentation tests with 10 carbohydrates and one amino acid for typification. Results showed that eight strains of *P. multocida* corresponded to biovar 1 and the others to biovars 3, 4, 6, 10 and 11, while 11 strains of *G. anatis* corresponded to biovar *haemolytica* and one strain to biovar *anatis*.

Key words: broiler, hen, duck, microbial fermentation, avian respiratory syndrome

INTRODUCCIÓN

La mejora genética para obtener aves de alta producción y las condiciones de manejo pueden predisponer a la aparición del síndrome respiratorio (SRA), el cual puede ser producido por una combinación de infecciones virales (Newcastle, Bronquitis infecciosa, Rinotraqueitis aviar, y Laringotraqueitis, entre otras) y bacterianas (*Avibacterium*, *Pasteurella*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma* y *Bordetella*, entre otras) (Muhairwa *et al.*, 2002). Asimismo, en forma individual, estos microorganismos pueden causar signos y lesiones clínicas similares (Muhairwa *et al.*, 2002).

Las especies *Pasteurella multocida* y *Gallibacterium anatis* tienen una participación importante en el SRA y son aislados con frecuencia en el análisis microbiológico. Estos microorganismos causan entre 15 y 20% de mortalidad. Las aves que sobreviven ocasionan una disminución en el comportamiento reproductivo afectando la productividad de las granjas (Vásquez *et al.*, 2001; Bojesen *et al.*, 2003; Bisgaard *et al.*, 2005), además de permanecer como portadoras (Calnek, 2000).

P. multocida es el agente infeccioso del cólera aviar, presente mayormente en pollos de carne y pavos (Blackall y Mifflin, 2000; Jonas *et al.*, 2001; Shivachandra *et al.*, 2005; Corney *et al.*, 2007). Esta bacteria fue divi-

dida en tres subespecies (*multocida*, *septica* y *gallicida*) en 1985, y se diferencian por su habilidad de fermentar carbohidratos (Vadillo *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2005; Ekundayo *et al.*, 2008); además, se reconocen 15 biovares de estas subespecies, cuya denominación va del 1 al 15.

G. anatis ha sido reportada como un organismo aviar semejante a *P. haemolytica*, *A. salpingitidis* o *P. anatis*, pero actualmente se encuentra incluida dentro del nuevo género *Gallibacterium* de la familia Pasteurellaceae (Christensen *et al.*, 2003). Este género solo contiene la especie *G. anatis* con dos biovares (Christensen *et al.*, 2003), que se diferencian por fermentar determinados sustratos y por su acción hemolítica positiva (*G. anatis* biovar *haemolytica*) o negativa (*G. anatis* biovar *anatis*) (Bisgaard *et al.*, 2005; García-Gómez *et al.*, 2005; Bojesen *et al.*, 2007; Rzewuska *et al.*, 2007).

Dado que las bacterias involucradas en el SRA no producen signos y lesiones clínicas patognomónicas, es casi imposible realizar un efectivo diagnóstico clínico, de allí que se necesita identificar los patógenos a través de pruebas de laboratorio (Calnek, 2000). Asimismo, es importante determinar su presencia y frecuencia de los biovares en aves en el país. El objetivo de esta investigación fue determinar los biovares de *P. multocida* y *G. anatis* presentes en las aves comerciales de la costa y de la selva del Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 25 casos respiratorios en pollos de carne, gallinas ponedoras y patos de granjas localizadas en los departamentos peruanos de Lima (17 casos), La Libertad (5), Ica (1), Tacna (1) y Ucayali (1), en un lapso de cinco meses. El tamaño de las empresas en términos de número de aves era muy diverso. En cada caso, se tomaron hisopados de barbillas, senos infraorbitales, tráqueas, pulmones y sacos aéreos, así como de improntas de hígado y bazo de las aves afectadas.

Las muestras se trabajaron en los Laboratorios Bioservice, Lima. Fueron cultivadas en agar sangre y agar MacConkey e incubadas en condiciones anaeróbicas a 37 °C por 24 a 48 h (Carter y Cole, 1990; Diallo y Frost, 2000). Se hizo el análisis de las características microscópicas de las colonias (Quentin y Russel, 1991), seguido del análisis bioquímico de oxidasa, catalasa, indol y ureasa (Vadillo *et al.*, 2002).

Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas de fermentación de carbohidratos: glucosa, arabinosa, dulcitol, lactosa, maltosa, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa y xilosa, y el aminoácido ornitina (Calnek, 2000). La capacidad de fermentación de las cepas se midió a través de un medio basal consistente en peptona al 1%, NaCl al 0.5%, púrpura de bromocresol al 1% y carbohidrato/aminoácido al 20% con pH de 6.8. En un microtubo por cada sustrato se dispensó 200 µl de medio basal, 10 µl del carbohidrato o aminoácido y 10 µl del inóculo (una colonia de cada cepa se diluyó en 2 ml de caldo nutritivo). Se incubaron a 37 °C por 24 a 48 h. Un color amarillo se consideró como reacción positiva y un color púrpura como reacción negativa.

RESULTADOS

Se aislaron e identificaron 25 cepas de *P. multocida* y *G. anatis*. De estas, 13 fue-

ron identificadas como biovar 1 (8 aislamientos), 3, 4, 6, 10 y 11 (un aislamiento por biovar) de *P. multocida*, mientras que 12 cepas correspondieron a *G. anatis* biovar *haemolytica* (11 aislamientos) y *anatis* (1 aislamiento). En ningún caso ocurrió una infección mixta. El Cuadro 1 muestra la procedencia por departamento de los aislamientos de *P. multocida* y de *G. anatis*.

Las cepas de *P. multocida* se distinguieron por su habilidad de fermentar arabinosa, maltosa, sorbitol, trehalosa y xilosa, lo que permitió la identificación de seis biovars (Cuadro 2), donde seis de ellos fueron de la

Cuadro 1. Procedencia de aislamientos de *Pasteurella multocida* y de *Gallibacterium anatis* de aves afectadas con procesos respiratorios en cinco departamentos del Perú

Departamento	<i>P. multocida</i>	<i>G. anatis</i>
Ica	1	0
La Libertad	3	2
Lima	7	10
Tacna	1	0
Ucayali	1	0

subespecie *multocida*, no pudiéndose determinar la subespecie de los biovars 6 y 11. Por otro lado, las cepas de *G. anatis* se diferenciaron por los resultados en la fermentación de lactosa, maltosa y trehalosa (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Once de las 13 cepas de *P. multocida* correspondieron a la subespecie *multocida*, lo que sugiere que podría ser la subespecie más frecuente en patologías respiratorias aviarias en el país; sin embargo, se debe tener en cuenta el reducido número de mues-

Cuadro 2. Identificación de biovars¹ de *Pasteurella multocida* en aislados de muestras de aves afectadas con procesos respiratorios en cinco departamentos del Perú

		Biovar ²					
		1	3	4	6	10	11
Acidificación	Glucosa	+	+	+	+	+	+
	Arabinosa	-	-	-	-	-	+
	Dulcitol	-	-	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-	+	-
	Manitol	+	+	+	+	+	+
	Sorbitol	+	+	+	-	-	+
	Sacarosa	+	+	+	+	+	+
	Trehalosa	-	-	+	-	+	-
	Xilosa	-	+	-	-	+	-
ODC ³		+	+	+	+	+	+

¹ Fegan *et al.* (1995)

² Resultados en base a 8 aislamientos del biovar 1 y de un aislamiento para cada uno de los otros biovars

³ Ornithine decarboxylation

Cuadro 3. Identificación de biovars¹ de *Gallibacterium anatis* en aislados de muestras de aves afectadas con procesos respiratorios en cinco departamentos del Perú

		Biovar	
		<i>Haemolytica</i> (n=11 cepas)	<i>Anatis</i> (n=1 cepa)
Acidificación			
	Glucosa	+	+
	Arabinosa	-	-
	Lactosa	+	-
	Maltosa	+	-
	Manitol	+	+
	Sacarosa	+	+
	Trehalosa	+	-
	Xilosa	+	+
ODC ²		-	-

¹ Blackall *et al.* (2008)

² Ornithine decarboxylation

tras. No obstante, esta subespecie ha sido reportada como la más frecuente en Australia (Blackall *et al.*, 1995; Fegan *et al.*, 1995), Estados Unidos (Aye *et al.*, 2001), Indonesia (Jonas *et al.*, 2001) y Nigeria (Ekundayo *et al.*, 2008). Ninguna de las cepas evaluadas en el presente estudio correspondió a las subespecies *septica* y *gallicida*, las cuales se hallaron en los estudios mencionados de Indonesia y Nigeria.

Se ha descrito que la subespecie *multocida* involucra los biovares 1, 2, 3, 4, 9, 10, 12, 13 y 14, la subespecie *septica* contiene el biovar 7 y la subespecie *gallicida* el biovar 8 (Fegan *et al.*, 1995). De los seis biovares identificados, el biovar 1 fue el más común, resultado que concuerda con los hallazgos de Jonas *et al.* (2001), donde este biovar se encontró en 6 de las 9 cepas evaluadas de *P. multocida*; sin embargo, en el trabajo de Fegan *et al.* (1995), los biovares 2 y 3 fueron los más comunes, produciendo lesiones más severas en los órganos comprometidos. Por otro lado, los biovares 3, 4, 6, 10 y 11, encontrados en el presente estudio, fueron asimismo identificados por Fegan *et al.* (1995), con la excepción del biovar 11. El biovar 1 fue aislado de diversos órganos, lo que confirma su potencial acción septicémica.

Con respecto a las 12 cepas de *G. anatis*, el biovar *haemolytica* predominó con 11 aislamientos sobre uno del biovar *anatis*. Esta predominancia también fue observada por Rzewuska *et al.* (2007), donde aislaron 13 cepas de *G. anatis* en pavos reales con síntomas respiratorios, y todas ellas fueron fenotípicamente identificadas como biovar *haemolytica*. En todo caso, se podría argumentar que los pavos son menos susceptibles a las infecciones respiratorias causadas por *G. anatis* que las aves de corral y que pueden actuar como una fuente de transmisión de este microorganismo. Por otro lado, la severidad de las lesiones y los diversos órganos donde se aisló la bacteria, sugieren la

capacidad invasiva de *G. anatis*, principalmente en el caso del biovar *haemolytica* (Bojesen *et al.*, 2004; Bojesen y Shivaprasad, 2007).

CONCLUSIONES

- Se identificaron 13 cepas de *P. multocida* y 12 cepas de *G. anatis*.
- Ocho cepas de *P. multocida* correspondieron al biovar 1 y las otras a los biovares 3, 4, 6, 10 y 11.
- De 12 cepas de *G. anatis*, 11 fueron identificadas como biovar *haemolytica* y solo una correspondió al biovar *anatis*.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Dr. Patrick J. Blackall por facilitar los cuadros de identificación bioquímica de las subespecies de *P. multocida* y *G. anatis*.

LITERATURA CITADA

1. **Aye PE, Angrick T, Morishita T, Harr B. 2001.** Prevalence and characteristics of *Pasteurella multocida* in commercial turkeys. *Avian Dis* 45: 182-190.
2. **Bisgaard M, Christensen H, Bojesen AM, Christensen JP. 2005.** Avian infections by species of *Pasteurellaceae*, an update. *Avian Dis* 49: 534-539.
3. **Blackall PJ, Pahoff JL, Marks D, Fegan N, Morrow CJ. 1995.** Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera outbreaks on turkey farms. *Austr Vet J* 72: 135-138.
4. **Blackall P, Mifflin J. 2000.** Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. *Avian Pathol* 29: 271-287.
5. **Blackall PJ, Norskow-Lauritsen N. 2008.** *Pasteurellaceae* – the view from the diagnostic laboratory. En: Kuhnert P,

- Christensen H (eds). *Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects*. Norwich, UK: Horizon Scientific Press. p 227-259.
6. **Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M. 2003.** Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathol* 32: 503-510.
 7. **Bojesen AM, Nielsen O, Christensen J, Bisgaard M. 2004.** *In vivo* studies of *Gallibacterium anatis*. *Avian Pathol* 33: 145-152.
 8. **Bojesen A, Shivaprasad H. 2007.** Genetic diversity of *Gallibacterium* isolates from California turkeys. *Avian Pathol* 36: 227-230.
 9. **Bojesen AM, Vásquez ME, Robles F, Gonzales C, Soriano EV, Olsen JE, Christensen H. 2007.** Specific identification of *Gallibacterium* by PCR using primers targeting the 16S rRNA genes. *Vet Microbiol* 123: 262-268.
 10. **Calnek B. 2000.** Enfermedades de las aves. 2ª ed. México: Ed Manual Moderno. 1067 p.
 11. **Carter G, Cole J. 1990.** Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5th ed. San Diego, USA: Academic Press Ltd. 305 p.
 12. **Christensen H, Bisgaard M, Bojesen A, Mutters R, Elmerdahl J. 2003.** Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, «*Actinobacillus salpingitidis*» or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 275-287.
 13. **Corney BG, Diallo IS, Wright LL, Hewitson GR, De Jong AR, Burrell PC, Duffy PF, et al. 2007.** *Pasteurella multocida* detection by 5' *Taq* nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. *J Microbiol Methods* 69: 376-380.
 14. **Diallo I, Frost A. 2000.** Characteristics of a haemolytic extract from avian *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 72: 37-45.
 15. **Ekundayo S, Odugbo M, Olabode A, Okewole P. 2008.** Phenotypic variability among strains of *Pasteurella multocida* isolated from avian, bovine, caprine, leporine and ovine origin. *Afr J Biotechnol* 7: 1347-1350.
 16. **Fegan N, Blackall PJ, Pahoff JL. 1995.** Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Vet Microbiol* 47: 281-286.
 17. **García-Gómez E, Vaca S, Pérez-Méndez A, Ibarra-Caballero J, Pérez-Márquez V, Tenorio V, Negrete-Abascal E. 2005.** *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade IgG. *Avian Pathol* 34: 426-429.
 18. **Jonas M, Morishita T, Angrick W, Jahja J. 2001.** Characterization of nine *Pasteurella multocida* isolates from avian cholera outbreaks in Indonesia. *Avian Dis* 45: 34-42.
 19. **Muhairwa A, Christensen JP, Bisgaard M. 2002.** Serum resistance of *Pasteurella multocida* in avian and porcine sera, and comparative virulence investigations of selected serum-sensitive and resistant strains in chickens. *Avian Pathol* 31: 183-191.
 20. **Quentin N, Russel M, 1991.** Bacteriología y micología médicas. 2da ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana. 713 p.
 21. **Quinn P, Markey B, Carter M, Donnelly W, Leonard F. 2005.** Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Zaragoza: Acribia. 667 p.
 22. **Rzewuska M, Karpinska E, Szeleszczuk P, Binek M. 2007.** Isolation of *Gallibacterium* spp from peacocks with respiratory tract infections. *Medycyna Wet* 63: 1431-1433.
 23. **Shivachandra SB, Kumar AA, Gautam R, Saxena MK, Chaudhuri P, Srivastava SK. 2005.** Detection of

- multiple strains of *Pasteurella multocida* in fowl cholera outbreaks by polymerase chain reaction-based typing. *Avian Pathol* 34: 456-462.
24. **Vadillo S, Píriz S, Mateos E. 2002.** Manual de microbiología veterinaria. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 843 p.
25. **Vásquez M, Campogarrido M, Cubillas C, Coss J, Gonzales C, Sivanandan V. 2001.** Reporte de un caso de *Pasteurella haemolytica* en gallina de postura (Babcock) en Tehúacan Puebla. ANECA Symposium, México DF.