

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
**Biogeografía de los patógenos respiratorios de la nariz a los bronquios
en el ganado vacuno de carne**

Estudiante

Lissy Marie Licona Pineda

Asesores

John Jairo Hincapié Ph.D

Tim Johnson Ph.D

Honduras, octubre 2024

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

JULIO NAVARRO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	4
Índice de Figuras	5
Índice de Anexos	6
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Materiales y Métodos	11
Localización	11
Metodología	11
Recolección de Muestras	11
Extracción y Cuantificación de ADN	12
Preparación de Muestras para qPCR	13
Preparación de Cebadores	13
Elaboración de qPCR	13
Análisis Estadístico	14
Resultados y Discusión	16
Conclusiones	27
Recomendaciones	28
Referencias	29
Anexos	31

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Distribución de los animales divididos por grupo según su agente causal	12
Cuadro 2 Distribución de muestras recolectadas del tracto respiratorio por cada grupo de animales.	12
Cuadro 3 Abundancia de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida en diferentes regiones del tracto respiratorio en el grupo de animales con P. multocida	16
Cuadro 4 Abundancia de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida en diferentes regiones del tracto respiratorio en el grupo de animales con M. haemolytica	18
Cuadro 5 Abundancia de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida en diferentes regiones del tracto respiratorio en el grupo de animales NO ERB.	20
Cuadro 6 Correlaciones entre la abundancia de Pasteurella multocida y Mannheimia haemolytica en diferentes ubicaciones del tracto respiratorio de animales con y sin ERB	22

Índice de Figuras

Figura 1 Abundancia media de M. haemolytica y P. multocida en el grupo de Animales PM en distintas regiones del tracto respiratorio	17
Figura 2 Abundancia promedio de M. haemolytica y P. multocida en el grupo de Animales MH en distintas regiones del tracto respiratorio	19
Figura 3 Abundancia promedio de M. haemolytica y P. multocida en el grupo de Animales “NO ERB” en distintas regiones del tracto respiratorio.	21
Figura 4 Regresión 1.....	23
Figura 5 Regresión 2.....	24
Figura 6 Regresión 3.....	25
Figura 7 Regresión 4.....	25
Figura 8 Regesión 5	26

Índice de Anexos

Anexo A Toma de muestras a ganado vacuno	31
Anexo B Separación y almacenamiento de muestras.....	32
Anexo C Realizando las extracciones de ADN	33
Anexo D Realización de pruebas qPCR	34

Resumen

La Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB) tiene importantes repercusiones sanitarias y económicas. La *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* son los patógenos más comunes aislados de un pulmón enfermo. Este estudio tuvo como objetivo analizar la bioecología microbiana del tracto respiratorio bovino, evaluando la abundancia de los patógenos bacterianos en las regiones nasal, nasofaríngea, tráquea y bronquial del ganado y desvelar posibles lugares de muestreo predictivos para determinar un patógeno pulmonar activo. Se recogieron muestras de todas las localizaciones del tracto respiratorio de 100 reses muertas. El laboratorio Texas Medical Veterinary Diagnostic identificó los agentes patógenos. Se identificaron 15 animales infectados por *Mannheimia haemolytica* y 15 por *Pasteurella multocida*. Se extrajo ADN de esos treinta animales, así como de 15 que murieron por otra causa y se realizaron pruebas de q-PCR para comparar la abundancia de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en todas las localizaciones del tracto respiratorio. En el grupo de animales con *Pasteurella multocida*, la *Mannheimia haemolytica* no mostró una variación significativa en su abundancia a lo largo del tracto respiratorio. Mientras que *Pasteurella multocida* si presenta una mayor concentración al ser su agente causal. En el grupo de animales con *Mannheimia haemolytica*, la *Pausterella multocida* mantiene niveles más constantes y bajos a lo largo del tracto respiratorio. Mientras que *Mannheimia haemolytica* si presenta una mayor concentración al ser su agente causal. En los animales NO ERB, *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* tienen abundancias bajas y similares en el tracto respiratorio. En las regresiones lineales simples más altas que fueron de 80.3% y 81.9%, muestran relaciones significativas entre las abundancias de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* en los bronquios y cada una puede influir significativamente en la otra.

Palabras clave: abundancia bacteriana, ecología microbiana, Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB), patógenos respiratorios, tracto respiratorio bovino.

Abstract

Bovine Respiratory Disease (BRD) has important health and economic implications. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* are the most common pathogens isolated from diseased lung. This study aimed to analyze the microbial bioecology of the bovine respiratory tract by assessing the abundance of bacterial pathogens in the nasal, nasopharyngeal, tracheal and bronchial regions of cattle and to uncover possible predictive sampling sites for determining an active lung pathogen. Samples were collected from all locations in the respiratory tract of 100 carcasses. Pathogens were identified by Texas Medical Veterinary Diagnostic Laboratory. Fifteen *Mannheimia haemolytica* and 15 *Pasteurella multocida* infected animals were identified. DNA was extracted from these 30 animals, as well as from 15 that died from another cause, and q-PCR tests were performed to compare the abundance of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* at all locations in the respiratory tract. In the *Pasteurella multocida* group of animals, *Mannheimia haemolytica* showed no significant variation in abundance along the respiratory tract. While *Pasteurella multocida* did present a higher concentration as its causative agent. In the group of animals with *Mannheimia haemolytica*, *Pausterella multocida* maintained more constant and lower levels along the respiratory tract. While *Mannheimia haemolytica* does present a higher concentration as its causative agent. In the NO ERB animals, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* have low and similar abundances in the respiratory tract. In the highest simple linear regressions, which were 80.3% and 81.9%, show significant relationships between the abundances of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in the bronchi and each can significantly influence the other.

Keywords: bacterial abundance, Bovine Respiratory Disease (BRD), bovine respiratory tract, microbial ecology, respiratory pathogens.

Introducción

La enfermedad respiratoria bovina (ERB) tiene un importante impacto económico negativo en las industrias bovina y láctea. A pesar de décadas de investigación sobre su control, la ERB y sus efectos siguen siendo las principales causas de morbilidad y mortalidad en el ganado, así como de problemas de bienestar y pérdidas en la producción (Buckham et al., 2008). El ganado vacuno recién destetado y transportado corre un riesgo aún mayor de contraer la enfermedad de la carne de bovino, que contribuye a aproximadamente el 70-80% de la morbilidad total en las explotaciones de engorde y a aproximadamente el 10-50% de la mortalidad en las mismas, además de provocar la consiguiente pérdida de rendimiento y salud (Sanderson et al., 2008).

La ERB suele manifestarse en el ganado vacuno dentro de las cuatro semanas posteriores a su transporte a un cebadero. Presenta múltiples signos clínicos que varían significativamente según la fase y la gravedad de la enfermedad. Según White y Renter (2009) los signos generales pueden incluir depresión, falta de apetito, letargo y fiebre. Además, en el ganado diagnosticado con ERB se han observado diversos síntomas respiratorios, como secreción ocular y nasal, tos, salivación excesiva, y alteraciones en la frecuencia y el ritmo respiratorio.

Esta enfermedad está causada por una infección bacteriana y/o vírica en las vías respiratorias del ganado vacuno comprometiendo su sistema inmunitario (Babcock et al., 2010). La composición microbiana de las vías respiratorias y el aumento de la incidencia de patógenos respiratorios están asociados con la neumonía en el ganado de carne, que también puede colaborar con el sistema inmunitario del huésped y metabolizar productos para crear defensas esenciales contra las infecciones causadas por patógenos oportunistas (Klima et al., 2019).

El ecosistema respiratorio incluye el tracto respiratorio superior (TRS) y el inferior (TRI) desde el punto de vista anatómico y fisiológico. En cuanto a los entornos específicos de cada nicho en el tracto respiratorio, la microbiota asociada a cada nicho habita y se diferencia dentro de cada entorno específico. El TRS incluye las fosas nasales, las amígdalas y la nasofaringe, mientras que el TRI incluye

la laringe, la tráquea, el bronquio traqueal, la bifurcación traqueal, los bronquios, los bronquiolos, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alvéolos (Man H. et al., 2017).

Los patógenos bacterianos más frecuentemente asociados con los casos de ERB son *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, se han identificado tradicionalmente a través de métodos basados en el cultivo y representa una interacción compleja entre el huésped, el patógeno y el medio ambiente (Cirone et al., 2019). *M. haemolytica* y *P. multocida* son anaerobios facultativos gramnegativos de la familia *Pasteurellaceae*. Ambos son cocobacilos de 0.2 μm por 2.0 μm y suelen ser positivos para la oxidasa, reductores de nitratos y fermentadores de carbohidratos. Así mismo, elaboran factores de virulencia que les permiten eludir la eliminación y activar la inflamación. En algunos bovinos se encuentran cada vez más cepas de estos patógenos extremadamente resistentes a los medicamentos (Snyder y Credille, 2020).

En atención a lo anteriormente expuesto, se llevó a cabo una investigación en la comprensión de la ecología microbiana del tracto respiratorio bovino. Este estudio se centrará en la caracterización de las comunidades bacterianas en las diferentes localizaciones del tracto respiratorio bovino, tanto en aquellos animales afectados con enfermedad respiratoria bovina (ERB) como en los que no la padecen. Con los objetivos de comparar la abundancia de patógenos (*Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*) y cómo varía longitudinalmente en las diferentes partes del tracto respiratorio: cavidad nasal, nasofaringe, tráquea y bronquio. Así mismo, determinar si la presencia de estos patógenos en los bronquios puede predecirse a partir de su abundancia en otras áreas del tracto respiratorio.

Materiales y Métodos

Localización

El estudio se llevó a cabo en el departamento de Ciencias Animales de la Universidad de Purdue, ubicada en la ciudad de West Lafayette, en el estado de Indiana, Estados Unidos, durante el periodo de enero-abril del 2024. La primera parte del estudio comprendió la recolección de muestras en la Escuela de Medicina Veterinaria, ubicada en la Universidad de Texas Tech , Amarillo, TX 79106, EE.UU.

La segunda parte del estudio consistió en el análisis, a nivel molecular en cuanto a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real de las muestras colectadas (qPCR). Esta actividad se llevó a cabo en el laboratorio de “Food Animal Microbiome” en el departamento de Ciencias Animales de la Universidad de Purdue.

Metodología

Recolección de Muestras

La primera parte del estudio fue desarrollado por el Dr. Johnson con su equipo de laboratorio que trabajaron en la recolección de muestras en hisopados de ciertas localizaciones del tracto respiratorio (cavidad nasal, nasofaringe, tráquea y bronquio) en 100 animales de ganado vacuno muertos de forma natural. Un veterinario de campo realizó la necropsia para determinar la causa más probable de la muerte, si los animales utilizados tenían o no la ERB y cuál era el agente causal, en un laboratorio de diagnóstico veterinario llamado Texas Medical Veterinary Diagnostic Laboratory (TMVDL).

Se determinó que la mitad (50) habían muerto por ERB y la otra mitad (50) por otra causa (principalmente timpanismo). Al momento en que se realizó la necropsia, se identificaron quince animales infectados por *Mannheimia haemolytica* y quince por *Pasteurella multocida*. Siendo así el agente causal ya que son dos bacterias involucradas en la ERB que fueron encontradas en el tejido pulmonar.

Cuadro 1

Distribución de los animales divididos por grupo según su agente causal

Agente causal	Cantidad
<i>M. heamolytica</i>	15
<i>P. multocida</i>	15
NO ERB	15

Nota. NO ERB se le llamó a los animales que no murieron por ERB; ERB= Enfermedad Respiratoria Bovina

Luego de recolectar cada una de las muestras por cada grupo de animales (Cuadro 1), estas se almacenaron en un congelador -80°C para evitar que las bacterias continuaran creciendo, afectando en la composición microbiana de las mismas.

Cuadro 2

Distribución de muestras recolectadas del tracto respiratorio por cada grupo de animales.

Grupo de animales	Cantidad	Localizaciones del tracto respiratorio	n= total número de muestras
<i>M. heamolytica</i>	15	cavidad nasal, nasofaringe, tráquea y bronquio	60
<i>P. multocida</i>	15	cavidad nasal, nasofaringe, tráquea y bronquio	60
NO ERB	15	cavidad nasal, nasofaringe, tráquea y bronquio	60

Nota. NO ERB se le llamó a los animales que no murieron por ERB; ERB= Enfermedad Respiratoria Bovina

Extracción y Cuantificación de ADN

El ADN se extrajo de las muestras provenientes de cada localización del tracto respiratorio utilizando el kit "DNEasy Tissue" producido por la empresa Qiagen. Este protocolo utiliza como método de extracción de ADN en donde la membrana DNeasy utiliza una membrana de sílice con proteinasa K para la ruptura de pared celular permitiendo la salida de la información genética.

Junto con el sistema de centrifugación QIAGEN 96-Well-Plate hace que el ADN se adhiera a la membrana en presencia de alta concentración de sal caotrópica, que deshidrata las moléculas en

solución. Los tampones en los procedimientos "DNeasy Tissue" son diseñados para permitir la adsorción específica del ADN y la eliminación óptima de contaminantes (Hull et al., 2018).

Después de la extracción, las 180 muestras se almacenaron a 4°C. Posteriormente, se cuantificó la concentración de ADN extraído de cada muestra utilizando los equipos "Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometers" y "Qubit 4 Fluorometer". Se emplearon dos equipos distintos para asegurar que las lecturas de concentración fueran precisas y consistentes, evitando así errores que podrían afectar los resultados al enviarlos para secuenciación.

Preparación de Muestras para qPCR

Las muestras de ADN luego de pasar por el proceso de cuantificación y en referencia al resultado obtenido, fueron divididas en dos platos con formato de 96 pocillos, de los cuales se añadieron 90 muestras de ADN en uno y 90 en otro, se almacenó los platos a 4°C para su posterior uso.

Preparación de Cebadores

El proceso de amplificación del gen 16s rRNA, requiere de cebadores específicos para dicha secuencia genética que permita que solo se amplifique la región genética deseada. Se emplearon las secuencias genéticas proporcionadas en el protocolo "16S Sequencing with the Illumina MiSeq Personal Sequencer" para el diseño de los cebadores. Siendo así los cebadores anti sentidos SGR -TMR y los cebadores sentidos SGF -TMF.

Elaboración de qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, comúnmente conocida como qPCR, es la técnica más precisa y específica para amplificar una secuencia de ADN objetivo y cuantificar la concentración de esa secuencia en la muestra (Forootan et al., 2017). Se utilizó una comunidad de bacterias conocida (Comunidad Mock) como el control positivo y agua como control negativo y así se logró verificar si el proceso de amplificación se realizó de forma correcta.

Se utilizó el equipo "Mastercycler" para realizar dicha actividad, trabajando de la siguiente manera:

Temperatura de inicio de desnaturalización 95°C por 10 minutos.

Temperatura de desnaturalización 95°C por 5 minutos.

Temperatura de hibridación de cebadores 55°C por 45 segundos.

Temperatura de elongación 72°C por 5 minutos.

Temperatura de elongación final 72°C por 10 minutos.

Temperatura de enfriado de muestras 4°C.

36 ciclos total.

Se prepararon 12 placas que fueron analizadas utilizando los protocolos "PastuerellaProbes" y "MannheimiaProbes" para cuantificar la concentración específica de cada una de estas bacterias en todas las muestras. La preparación de la reacción (20 µL volumen final) para qPCR se realizó de la siguiente forma:

Se agregaron 16 µL de "Master Mix" en un tubo "Eppendorf"

Se agregaron 1 µL de cebador sentido

Se agregó 1 µL de cebador anti sentido

Se agregó 2 µL de muestra de ADN

Se mezcló la mezcla completa usando el vórtex por cinco segundos.

Se corrieron las muestras para la qPCR y se analizaron los resultados obtenidos.

Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en el cual cada grupo de animales fue considerado como un tratamiento independiente, con 15 repeticiones por tratamiento. Los parámetros fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA), empleando el modelo lineal general y la prueba de rangos múltiples de DUNCAN, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, utilizando el programa estadístico *Statistical Analysis System* (SAS). La normalidad de los datos fue verificada a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Adicionalmente, se aplicó la prueba de

correlación de Pearson y se realizaron análisis de regresión lineal simple, donde se identificaron correlaciones muy fuertes.

Resultados y Discusión

Animales con *Pasteurella multocida*

La abundancia de *Mannheimia haemolytica* no presentó diferencias estadísticamente significativas ($P= 0.1432$). Las concentraciones promedio son: 2.869 en la región nasal, 3.4999 en la nasofaringe, 3.7434 en la tráquea y 3.0026 en los bronquios (Cuadro 3). Mientras que en la abundancia de *Pasteurella multocida* se observan diferencias estadísticamente significativas entre las distintas regiones ($P < 0.0001$). Las concentraciones promedio varían significativamente según van ubicadas en el tracto respiratorio, siendo la concentración más alta en la tráquea (Cuadro 3).

Cuadro 3

Abundancia de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en diferentes regiones del tracto respiratorio en el grupo de animales con *P. multocida*

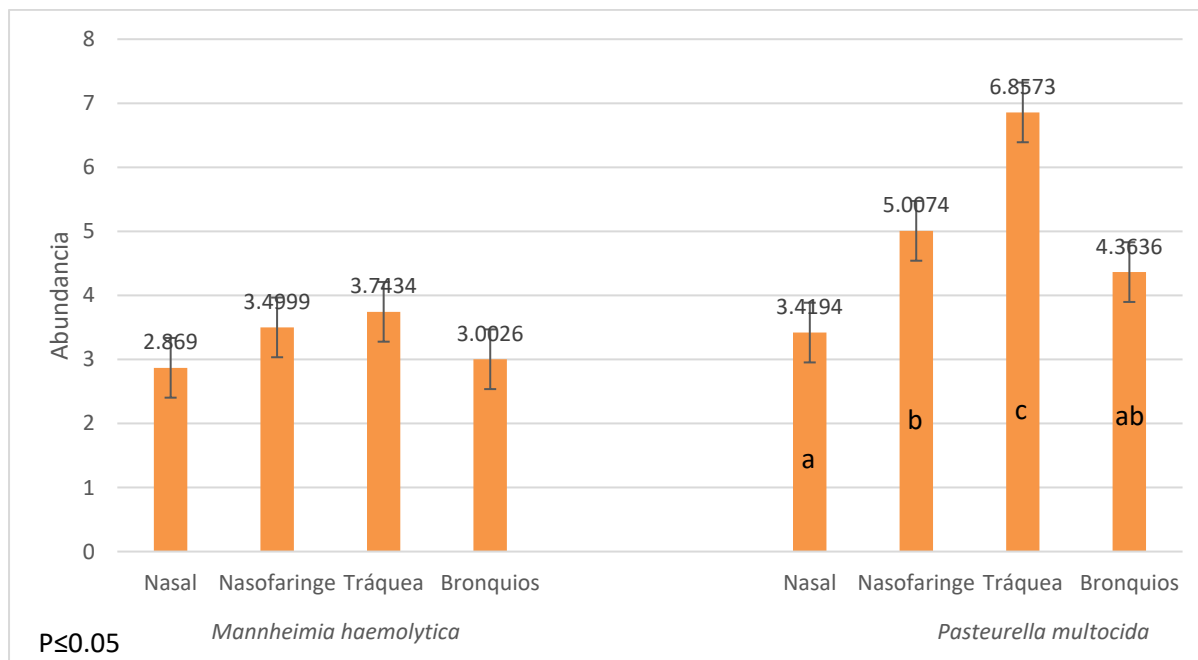
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	\pm EE	<i>Pasteurella multocida</i>	\pm EE
Nasal	2.869	0.2733	3.4194a	0.4408
Nasofaringe	3.4999	0.331	5.0074b	0.4714
Tráquea	3.7434	0.2937	6.8573c	0.213
Bronquios	3.0026	0.2736	4.3636ab	0.6183
P	0.1432		<0.0001	

Nota. Valores en columnas con distintas letras, difieren estadísticamente entre sí ($p \leq 0.05$); \pm EE= Error Estándar; P= Probabilidad

Se obtuvo que *Mannheimia haemolytica* tiende a concentrarse en menor cantidad y de manera uniforme en las regiones del tracto respiratorio, mientras que *Pasteurella multocida* tiene una distribución más abundante entre las regiones evaluadas (Figura 1). Hubbell (2001) dice que la eficiencia y la abundancia relativa en el entorno del sumidero del tracto respiratorio se ven afectadas por la dispersión aleatoria y la especiación, por lo que se concluye que la abundancia de las bacterias va aumentando y dispersando por todo el tracto respiratorio.

Figura 1

Abundancia media de *M. haemolytica* y *P. multocida* en el grupo de Animales PM en distintas regiones del tracto respiratorio



Animales con *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica se encuentra en mayores cantidades que *Pasteurella multocida* en todas las regiones del tracto respiratorio evaluadas (Cuadro 4). El valor de significancia estadística para *M. haemolytica* ($P = 0.0125$) indica una variación significativa en su distribución según la región anatómica, siendo más prevalente en la nasofaringe y la tráquea. En un estudio por Knight et al. (2018) concluyen que la existencia de *M. haemolytica* en la cavidad nasal del ganado afectó a su prevalencia en la tráquea, aunque sus abundancias en ambos sitios no estaban bien correlacionadas.

En contraste, la distribución de *P. multocida* no muestra variaciones significativas entre las distintas regiones del tracto respiratorio ($P = 0.1389$), lo que sugiere una colonización y distribución más uniforme de esta bacteria.

Cuadro 4

Abundancia de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida en diferentes regiones del tracto respiratorio en el grupo de animales con M. haemolytica

	<i>Mannheimia haemolytica</i>	±EE	<i>Pausterella multocida</i>	±EE
Nasal	3.9042a	0.6282	2.6891	0.3305
Nasofaringe	6.1944b	0.3611	3.8883	0.3568
Tráquea	5.8878b	0.5107	3.7984	0.4609
Bronquios	4.5974ab	0.5989	3.7568	0.436
P	0.0125		0.1389	

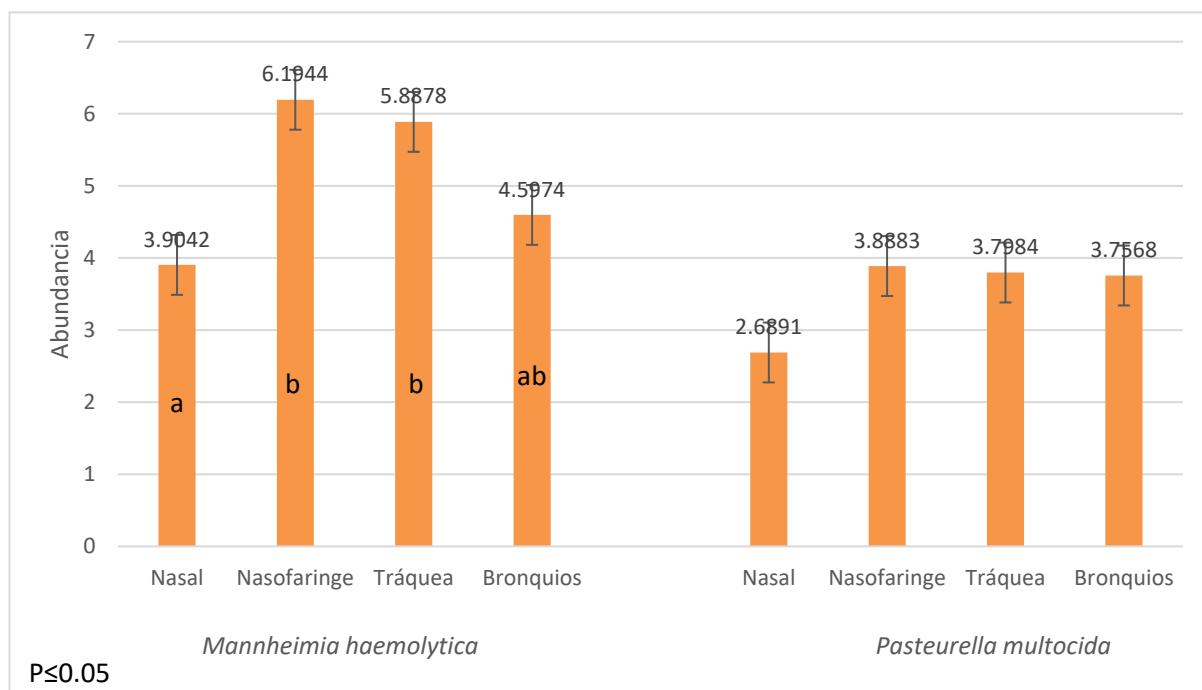
Nota: Valores en columnas con distintas letras, difieren estadísticamente entre sí ($p \leq 0.05$); ± EE= Error Estándar; P= Probabilidad

Mannheimia haemolytica muestra una mayor abundancia en su distribución a lo largo del tracto respiratorio, lo que indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) (Figura 2). Donde la región nasal es significativamente diferente de nasofaringe y tráquea. Nasofaringe y Tráquea no son significativamente diferentes entre sí, Lima et al. (2016) (Lima et al., 2016) identificaron que la microbiota de nasofaringe se ve afectada por el tiempo y la edad, concretamente con una disminución de la riqueza microbiana de los 3 a los 14 días de vida, lo que pone de manifiesto la característica dinámica de la población microbiana. Mientras que en los bronquios no presenta diferencias estadísticas claras de ninguna de las otras regiones.

Por otro lado, *Pasteurella multocida* presenta una distribución más uniforme y en menor abundancia en las distintas regiones sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figura 2

Abundancia promedio de *M. haemolytica* y *P. multocida* en el grupo de Animales MH en distintas regiones del tracto respiratorio



Animales NO ERB

En el área nasal, tanto *Mannheimia haemolytica* como *Pasteurella multocida* presentan la misma abundancia (2.2304) que difieren estadísticamente con las demás regiones del tracto respiratorio evaluadas (nasofaringe, tráquea y bronquios) donde sus abundancias fueron similares y no difieren estadísticamente entre ellas (Cuadro 5). Para *M. haemolytica*, el valor de $P=0.0009$ refleja diferencias significativas en su distribución solo de la región nasal con las demás regiones del tracto respiratorio, lo mismo para *P. multocida*, con un valor de $P < 0.0001$ indica una variación aún más marcada. En un estudio de patogenicidad *in vitro* e *in vivo* de cepas de *Pasteurella multocida*, Katoch *et al.* (2014) concluyen que esta bacteria se encuentra habitualmente como flora normal en la nasofaringe de diversos animales, se han descrito numerosos factores de virulencia y colonización.

Cuadro 5

Abundancia de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida en diferentes regiones del tracto respiratorio en el grupo de animales NO ERB.

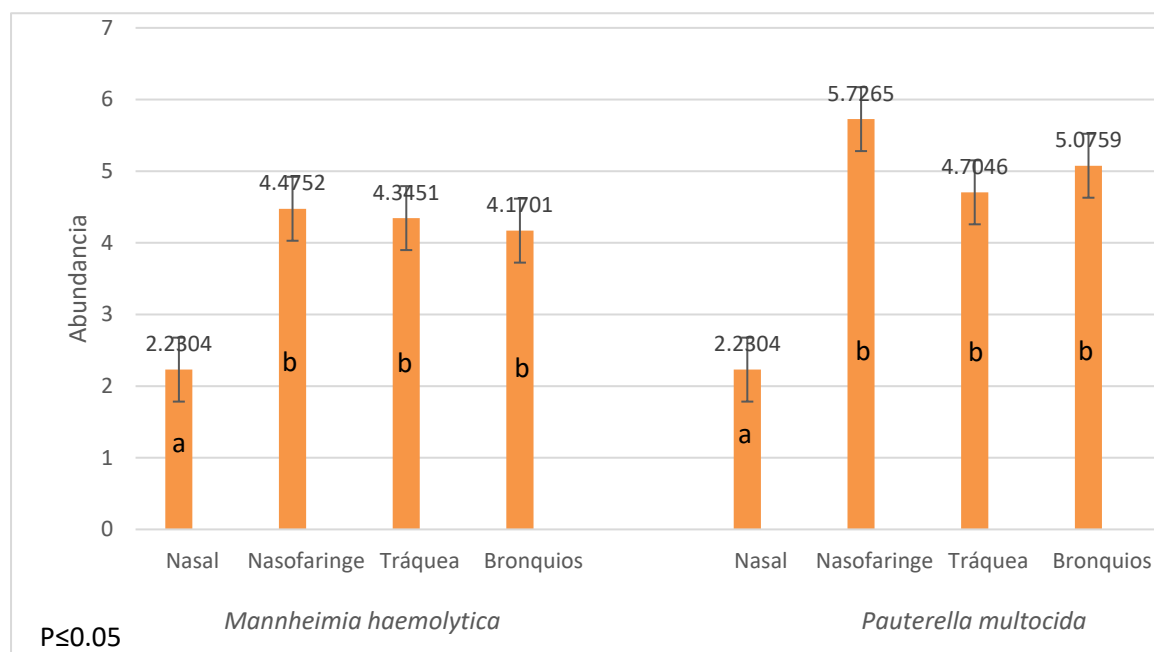
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	±EE	<i>Pausterella multocida</i>	±EE
Nasal	2.2304a	.	2.2304a	.
Nasofaringe	4.4752b	0.5	5.7265b	0.4536
Tráquea	4.3451b	0.4926	4.7046b	0.4434
Bronquios	4.1701b	0.4594	5.0759b	0.3528
P	0.0009		<0.0001	

Nota. Valores en columnas con distintas letras, difieren estadísticamente entre sí ($p \leq 0.05$); ± EE= Error Estándar; P= Probabilidad

Se encontró que las abundancias de *M. haemolytica* y *P. multocida* son similares en la mayoría de las ubicaciones del tracto respiratorio en los animales como se muestra en la (Figura 3), con la excepción de la región nasofaríngea donde *P. multocida* es significativamente más abundante. La teoría actualmente aceptada en relación con la patogénesis de la Enfermedad Respiratoria Bovina, es la compleja interacción sinérgica de bacterias y virus bajo la influencia de diversos factores de estrés (por ejemplo, el destete, la mezcla, el transporte y los cambios en la dieta), además de los cambios en el huésped y el medio ambiente para que esta llegue a ser fatal (Taylor et al., 2010).

Figura 3

Abundancia promedio de *M. haemolytica* y *P. multocida* en el grupo de Animales "NO ERB" en distintas regiones del tracto respiratorio.



Con relación al cuadro de correlaciones (Cuadro 6), este análisis fue utilizado para evaluar las relaciones entre la abundancia de bacterias (*Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*) en distintas ubicaciones del tracto respiratorio y si se pudiese predecir la abundancia de estas en los bronquios de animales con y sin Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB).

El análisis permitió identificar patrones de co-ocurrencia bacteriana y comprender la distribución y asociación de estas bacterias en diferentes zonas, como la cavidad nasal, nasofaringe, tráquea y bronquios. Las correlaciones positivas y negativas fuertes sugieren diferencias significativas en la colonización bacteriana, destacando que en ciertos casos la presencia de una bacteria en una ubicación se relaciona con la presencia (correlación positiva) o ausencia (correlación negativa) de la otra en otra ubicación. Así mismo, se observó que algunas correlaciones fueron más pronunciadas en animales con ERB, lo que sugiere que la interacción entre las bacterias en distintos sitios del tracto respiratorio puede estar vinculada a la progresión de la enfermedad.

Cuadro 6

Correlaciones entre la abundancia de Pasteurella multocida y Mannheimia haemolytica en diferentes ubicaciones del tracto respiratorio de animales con y sin ERB

Animales MH		Coeficiente Pearson	Probabilidad	Interpretación	valor
Ubicación					
Nasal MH	Bronquios PM	-0.62663	0.0165	fuerte	negativa
Nasal MH	Bronquios MH	-0.58759	0.0271	fuerte	negativa
Nasal MH	Tráquea PM	-0.71688	0.0039	muy fuerte	negativa
Tráquea MH	Tráquea PM	0.58788	0.0212	fuerte	positiva
Tráquea PM	Bronquios PM	0.89615	<0.0001	muy fuerte	positiva
Bronquios MH	Tráquea PM	0.77291	0.0007	muy fuerte	positiva
Tráquea MH	Bronquios MH	0.6751	0.0058	fuerte	positiva
Tráquea MH	Bronquios PM	0.60001	0.018	fuerte	positiva
Bronquios MH	Bronquios PM	0.90525	<0.0001	muy fuerte	positiva
Animales PM					
Nasofaringe MH	Bronquios MH	-0.53481	0.04	fuerte	negativa
Bronquios PM	Bronquios MH	0.63758	0.0106	fuerte	positiva
Animales NO ERB					
Nasofaringe MH	Tráquea MH	0.56384	0.0286	fuerte	positiva
Tráquea MH	Tráquea PM	0.80391	0.0003	muy fuerte	positiva

Nota.: Interpretación de la fuerza de la correlación (de forma aproximada) de acuerdo con el coeficiente de Pearson:

0.0 a ± 0.1 : Correlación despreciable.

± 0.1 a ± 0.3 : Correlación débil.

± 0.3 a ± 0.5 : Correlación moderada.

± 0.5 a ± 0.7 : Correlación fuerte.

± 0.7 a ± 1.0 : Correlación muy fuerte.

El siguiente paso fue realizar un análisis de regresión utilizando las correlaciones muy fuertes identificadas en el cuadro anterior (Cuadro 6). Este análisis de regresión permite evaluar de manera más detallada las relaciones causales entre la abundancia de bacterias en diferentes ubicaciones del tracto respiratorio y cómo estos patrones se relacionan entre sí. Al centrarse en las correlaciones muy fuertes, se busca entender cuánto cambia la abundancia de una bacteria en una ubicación dada cuando varía la presencia o abundancia de otra bacteria en otra ubicación. Proporcionando una mayor claridad sobre la interacción bacteriana, ayudando a predecir la conducta bacteriana en función de

sus asociaciones en diferentes zonas del tracto respiratorio, lo que es crucial para comprender mejor la dinámica de la Enfermedad Respiratoria Bovina.

Cada modelo de regresión muestra un nivel de explicación diferente, representado por el porcentaje de variabilidad explicada (r^2), que indica cuánto de la variabilidad en la abundancia de PM se puede predecir a partir de la abundancia de MH en distintas ubicaciones.

Para la interpretación de los valores de regresión se utilizaron las reglas generales expuestas por Karl Pearson:

r^2 alto (generalmente > 0.7 o $> 70\%$)

r^2 moderado (0.5 a ≤ 0.7 o 50% a $\leq 70\%$)

r^2 bajo (< 0.5 o $< 50\%$)

Las 5 regresiones más fuertes (altas) fueron las siguientes:

Regresión 1: donde se puede observar en la Figura 6, se utilizó una fórmula con los siguientes datos

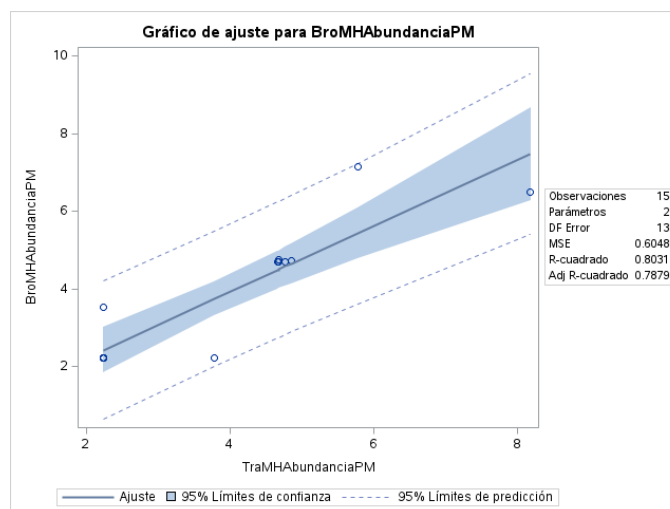
$Y_{ij} = 0.53670 + 0.84774 X$ (donde X = la abundancia de PM en tráquea de un animal positivo a MH)

Y_{ij} = abundancia de PM en bronquios de un animal positivo a MH

Con este modelo explica/predice el 80.3% de los resultados a través de la abundancia de PM en bronquios; predice en función de la abundancia de PM en la tráquea de animales positivos a MH.

Figura 4

Regresión 1



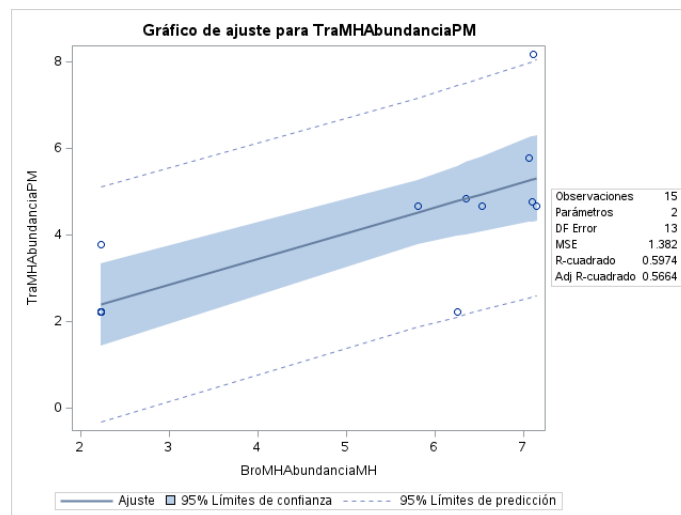
Regresión 2: donde se puede observar en (Figura 7) se utilizó una formula con los siguientes datos
 $Y_{ij}=1.06387 + 0.59481 X$ (donde X = a la abundancia de MH en los bronquios de un animal positivo a MH)

Y_{ij} = abundancia de PM en tráquea de un animal positivo a MH

Explica/predice el 59.7% de los resultados a través de la abundancia de PM en tráquea; predice en función de la abundancia de MH en bronquios de animales positivos a MH.

Figura 5

Regresión 2



Regresión 3: donde se puede observar en (Figura 8) se utilizó una formula con los siguientes datos

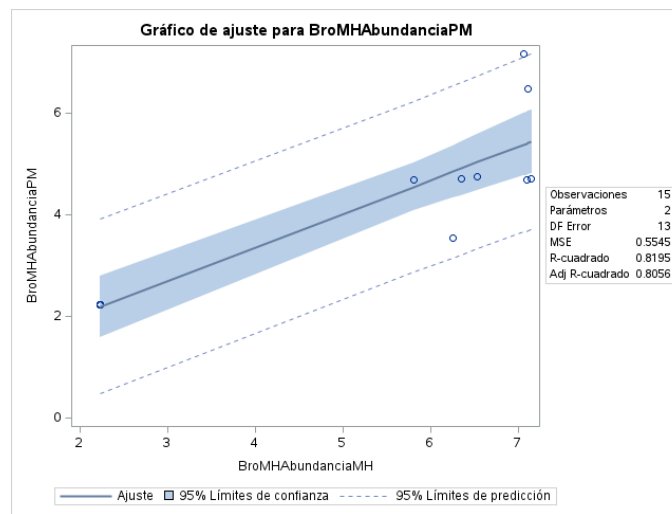
$Y_{ij}=0.72698 + 0.65902 X$ (donde X= a la abundancia de MH en bronquios en un animal positivo a MH)

Y_{ij} = abundancia de PM en bronquios de un animal positivo a MH

Explica/predice el 81.9% de los resultados indicando que la abundancia de PM en los bronquios se predice eficazmente a partir de la abundancia de MH.

Figura 6

Regresión 3



Regresión 4: donde se puede observar en (Figura 9) se utilizó una fórmula con los siguientes datos

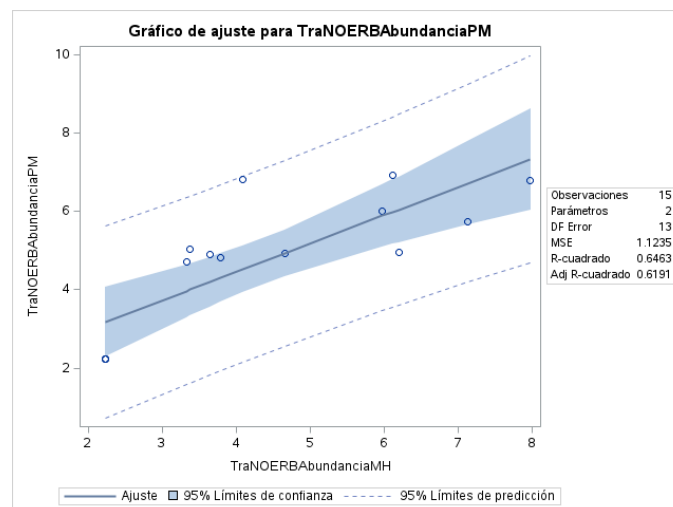
$Y_{ij} = 1.56058 + 0.72357 X$ (donde X = a la abundancia de MH en la tráquea de animales NO ERB)

Y_{ij} = abundancia de PM en la tráquea de animales NO ERB

Explica/predice el 64.6% de los resultados cuando se analiza la abundancia de PM y MH en la tráquea de animales negativos a ERB.

Figura 7

Regresión 4



Regresión 5: donde se puede observar en (Figura 10) se utilizó una fórmula con los siguientes datos

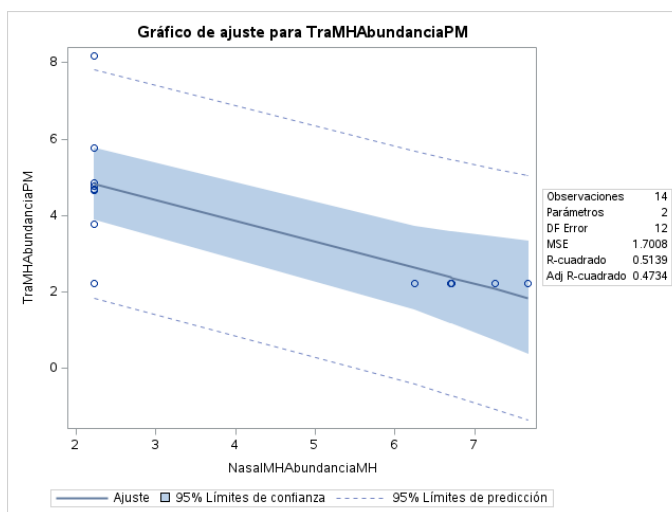
$Y_{ij} = 6.05045 + (-0.54811 X)$ donde $X =$ a la abundancia de MH en Nasal de animales positivos a MH

$Y_{ij} =$ abundancia de PM en la tráquea de animales positivos a MH

Explica/predice el 51.3%, lo que sugiere una menor capacidad predictiva cuando se considera la abundancia de MH en la cavidad nasal para predecir la abundancia de PM en la tráquea de animales positivos a MH.

Figura 8

Regesión 5



Conclusiones

En el grupo de animales con *Pasteurella multocida*, la *Mannheimia haemolytica* no muestra una variación significativa en su abundancia a lo largo del tracto respiratorio. Mientras que *Pasteurella multocida* si presenta una mayor concentración al ser su agente causal.

En el grupo de animales con *Mannheimia haemolytica*, la *Pausterella multocida* mantiene niveles más constantes y bajos a lo largo del tracto respiratorio. Mientras que *Mannheimia haemolytica* si presenta una mayor concentración al ser su agente causal.

En los animales NO ERB, *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* tienen abundancias bajas y similares en el tracto respiratorio.

Las correlaciones más fuertes observadas sugieren que, basándose en los datos de abundancia en los bronquios se podría hacer una predicción bastante precisa sobre la presencia de estas bacterias en la tráquea, lo que es valioso para el diagnóstico o monitoreo de la ERB.

En las regresiones más altas que fueron entre la tráquea y bronquios, muestran relaciones significativas entre las abundancias de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* en los bronquios y cada una puede influir significativamente en la otra.

Recomendaciones

Implementar estrategias de manejo que minimicen el estrés en los animales, ya que es un factor predisponente clave para las infecciones respiratorias.

Desarrollar y mantener programas de vacunación efectivos contra *M. haemolytica* y *P. multocida* para reducir la prevalencia de estas bacterias y minimizar el riesgo de infecciones respiratorias graves.

Utilizar las muestras de las áreas superiores del tracto respiratorio que sean más fácil de tomar y seguir realizando pruebas de laboratorio confiables para cuantificar con precisión las poblaciones de patógenos y tener una detección temprana antes de que la infección progrese a una etapa más grave.

Referencias

- Babcock, A. H., Renter, D. G. [D. G.], White, B. J. [B. J.], Dubnicka, S. R. y Scott, H. M. (2010). Temporal distributions of respiratory disease events within cohorts of feedlot cattle and associations with cattle health and performance indices. *Preventive Veterinary Medicine*, 97(3-4), 198–219. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.09.003>
- Buckham, S. K. R., Weber, P. S. D., Burton, J. L., Earley, B. y Crowe, M. A. (2008). Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *Journal of Animal Science*, 86(6), 1325–1334. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0762>
- Cirone, F., Padalino, B., Tullio, D., Capozza, P., Lo Surdo, M., Lanave, G. y Pratelli, A. (2019). Prevalence of Pathogens Related to Bovine Respiratory Disease Before and After Transportation in Beef Steers: Preliminary Results. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/ani9121093>
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L. y Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>
- Hubbell, P. (2001). *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography (MPB-32)* (Core Textbook). *Monographs in Population Biology: Vol. 32*. Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9781400837526>
- Hull, N., Miller, J., Berry, D., Laegreid, W., Smith, A., Klinghagen, C. y Schumaker, B. (2018). Optimization of *Brucella abortus* Protocols for Downstream Molecular Applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01894-17>
- Katoch, S., Sharma, M., Patil, D., Kumar, S. y Verma, S. (2014). In vitro and in vivo pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different ompA. *Veterinary Research Communications*, 38(3), 183–191. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9601-6>
- Klima, L., Holman, B., Ralston, J., Stanford, K., Zaheer, R., Alexander, W. y McAllister, A. (2019). Lower Respiratory Tract Microbiome and Resistome of Bovine Respiratory Disease Mortalities. *Microbial Ecology*, 78(2), 446–456. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01361-3>
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A. Kosciolk, T., McCall, L., McDonald, D., Melnik, V., Morton, T., Navas, J., Quinn, A., Sanders, G., Swafford, D., Thompson, R., Tripathi, A., Xu, Z., Zaneveld, R., . . . Dorrestein, C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(7), 410–422. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>
- Lima, F., Teixeira, A. V., Higgins, H., Lima, S. y Bicalho, C. (2016). The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Scientific Reports*, 6, 29050. <https://doi.org/10.1038/srep29050>
- Man H., Steenhuisen, A. y Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 259–270. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>

- Sanderson, W., Dargatz, D. y Wagner, A. (2008). Risk factors for initial respiratory disease in United States' feedlots based on producer-collected daily morbidity counts. *The Canadian Veterinary Journal*, 49(4), 373–378. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18481546/>
- Snyder, E. y Credille, B. (2020). Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in Bovine Respiratory Disease: How Are They Changing in Response to Efforts to Control Them? *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 36(2), 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.02.001>
- Taylor, D., Fulton, W., Lehenbauer, W., Step, L. y Confer, W. (2010). The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *The Canadian Veterinary Journal*, 51(10), 1095–1102. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2942046/>
- White, B. J [Brad J.] y Renter, D. G [David G.] (2009). Bayesian estimation of the performance of using clinical observations and harvest lung lesions for diagnosing bovine respiratory disease in post-weaned beef calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 21(4), 446–453. <https://doi.org/10.1177/104063870902100405>

Anexos

Anexo A

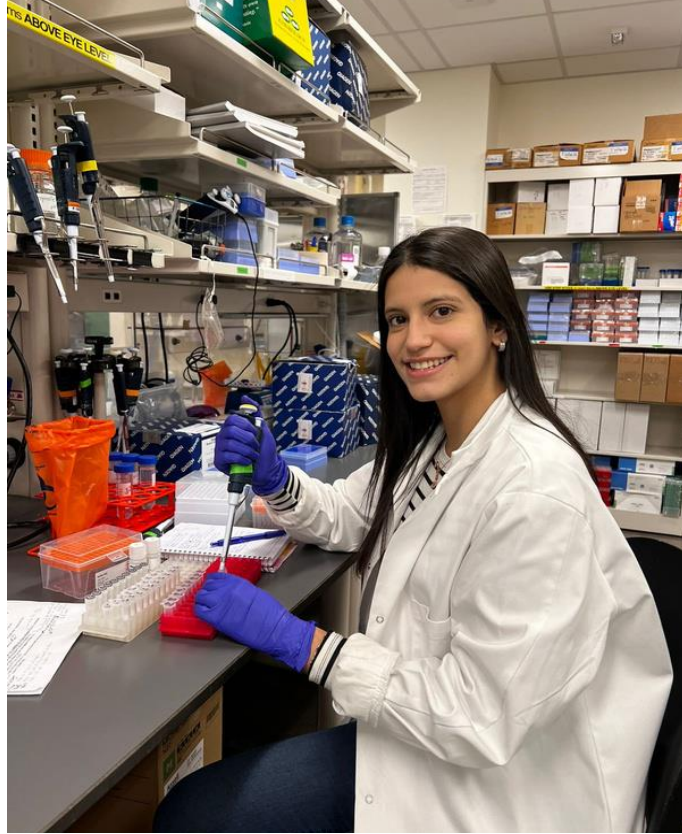
Toma de muestras a ganado vacuno



Anexo B*Separación y almacenamiento de muestras*

Anexo C

Realizando las extracciones de ADN



Anexo D*Realización de pruebas qPCR*