



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Pasteurella
multocida y Pasteurella haemolytica DE CAVIDAD
NASAL DE OVINOS EN XALATLACO, ESTADO DE MEXICO"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTAN:
EDUARDO ROMO CASTILLO
GABRIELA SALAZAR GOMEZ**

**ASESORES: MVZ. GILBERTO OCHOA URIBE
MVZ. M.C. JOSE DE LUCAS TRON**

COASESOR: QFB. LAURA JARAMILLO MEZA

CUAUTITLAN IZCALLI. EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

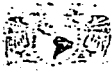


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

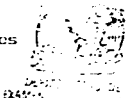


FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTOS AFROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
 A P E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos solicitar a usted que revise la IESIS:

Matrícula e identificación de Pasteurella multocida y
Pasteurella haemolytica de cavidad nasal de cerdos en
Veracruz, Estado de México

que presenta el pasante: Eduardo Rene Castillo
 con número de cuenta: 820887-7 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO AFROBATORIO.

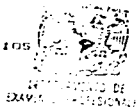
A T E N T A M E N T E .
 "POR MI RAZA HABLA EL ESPIRITU"
 Cuautitlan localid., Edo. de Mex., a 23 de Junio de 1997

PRESIDENTE MVE. Gilberto Ochoa Uribe
 VOCAL M.C. Alejandro Martínez Rodríguez
 SECRETARIO MVE. Silvano Irejo Nunez
 PRIMER SUPLENTE MVE. Raól Radillo Rodríguez
 SEGUNDO SUPLENTE M.C. J. Francisco Morales Alvarez



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN A. M.
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES SUPERIORES CUAUTITLÁN



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe de Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 20 del Reglamento General de Exámenes nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" Aislamiento e identificación de Pasteurella multocida y
Pasteurella Escroloptica de cavidad nasal de ovinos en
Xalatlaco Estado de México "

que presenta la pasante: Gabriela Salazar Gómez
con número de cuenta: 880805205 para obtener el TÍTULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI FAZCA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautilán Izcalli, Edo. de Mex., a 27 de Junio de 1997

PRESIDENTE: M.V.Z. Gilberto Cohen Uribe
VOCAL: M.C. Alejandro Martínez Rodríguez
SECRETARIO: M.V.Z. Silviano Ticio Nuñez
PRIMER SUPLENTE: M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez
SEGUNDO SUPLENTE: M.C. J. Francisco Morales Álvarez

DEDICATORIA

Para todos y por todo lo que aportaron, es que deseamos dirigirles nuestro agradecimiento: Primero que nada, a nuestras familias por su apoyo y gran paciencia; después a nuestros profesores por los conocimientos y consejos aplicados a éste trabajo, así como a sus buenas observaciones que nos impulsaron a mejorar. A todos nuestros amigos por estar ahí tanto en las buenas como en las malas. Y por último a tí ser biológico por el que me forjé el propósito de llegar y cumplir la función de un Médico Veterinario Zootecnista.

GRACIAS.

INDICE.

	Pp.
I.RESUMEN.....	1
II.INTRODUCCION.....	2
III.OBJETIVOS.....	7
IV.MATERIAL Y METODOS.....	8
V.RESULTADOS.....	12
VI.DISCUSION.....	22
VII.CONCLUSION.....	26
VIII.LITERATURA CITADA.....	27

INDICE DE FIGURAS

Pp.

FIGURA 1. Porcentaje de aislamientos de *Pasteurella spp.*.....14

FIGURA 2. Porcentaje de aislamiento de los tipos de *P. multocida* y los biotipos de *P. haemolytica*.....15

FIGURA 3. Porcentaje de aislamientos de *Pasteurella spp* por época del año en Xalatlaco, Estado de México.....16

INDICE DE CUADROS

Pp.

CUADRO 1. Pruebas bioquímicas para <i>Pasteurella spp.</i>.....	17
CUADRO 2. Modelo diferencial de los tipos A y D de <i>Pasteurella multocida</i>.....	18
CUADRO 3. Reacción fermentativa de carbohidratos para el tipo A y D de <i>Pasteurella multocida</i>.....	19
CUADRO 4. Diferenciación de los biotipos A y T de <i>Pasteurella haemolytica</i> mediante la reacción fermentativa de carbohidratos.....	20
CUADRO 5. Pruebas bioquímicas complementarias utilizadas para la identificación de <i>Pasteurella haemolytica</i>.....	21

I. RESUMEN.

El objetivo del presente trabajo fue aislar y tipificar los tipos de *P. multocida* y biotipos de *P. haemolytica* a partir de cavidad nasal de ovinos aparentemente sanos, pertenecientes a sistemas de producción trashumantes. Se recolectaron 230 muestras de 650 animales en 6 rebaños diferentes del Municipio de Nalatlaco, Estado de México, mediante hisopos estériles en el período de diciembre de 1995 a agosto de 1996. El análisis bacteriológico de las muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, utilizando placas de agar sangre e incubadas por 24 h. Las colonias se seleccionaron de acuerdo a su morfología macroscópicas y microscópicas. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación. Los estudios serológicos para tipificar los aislamientos fueron hechos en el CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR, utilizando la técnica de hemoaglutinación indirecta, con 16 antiseros monoespecíficos de referencia. De las 230 muestras recolectadas, se obtuvieron 46 aislamientos de *Pasteurella spp.*, correspondiendo 11 (23.9 %) a *P. multocida*, de las cuales 3 (6.5 %) fueron del tipo A y 8 (17.5 %) del tipo D. Por otro lado 35 aislamientos correspondieron a *P. haemolytica*, de las cuales 8 (17.5 %) fueron Biotipo A y 27 (58.7 %) del biotipo T. Sólo se encontró una cepa de serotipo A6, obteniéndose un 96.3 % de aislamientos no tipificables por hemoaglutinación indirecta. La variación estacional de *Pasteurella spp.* fue elevada y estadísticamente significativa en los meses de diciembre (40 %) y enero (33.3 %) en comparación con abril (6 %) y agosto (10.2 %), coincidiendo estos meses de porcentajes elevados con épocas de clima frío.

II. INTRODUCCION

Las neumonías son consideradas como uno de los principales problemas infecciosos que limitan el desarrollo de la producción ovina nacional, debido a que constituye una importante causa de pérdidas económicas, tanto por sus efectos negativos sobre la ganancia de peso, la baja conversión alimenticia y el alto costo por tratamientos; así como la mortalidad que ocasiona en los animales susceptibles.^{13, 46, 59, 68}

Los datos de prevalencia de neumonías varía de acuerdo al país de procedencia, tipos de explotación, edad de los animales y época del año en que se realiza el estudio. Se estima que las tasas promedio de prevalencia en corderos fluctúan del 10 al 40 %, tanto en México como en el extranjero.^{13, 14, 15, 35, 68}

En estudios donde se evaluó la mortalidad en corderos por etapas en el Estado de México, se demostró que la cifra alcanzada por neumonías era del 20.92 %.⁴⁴ Resultados similares fueron obtenidos en el hato ovino del COPEA, localizado en Topileje, D.F.³²

Trigo y Romero (1986), efectuando necropsias durante algunos años; observaron en 191 animales, que el 28 % de los casos murieron por cuadros neumónicos. Por otro lado, en investigaciones realizadas a 17 explotaciones ovinas en el Valle de Toluca, en un periodo de un año, se encontró que el 40 % murieron por problemas neumónicos.^{35, 67}

Existen gran variedad de agentes infecciosos que participan en la enfermedad respiratoria, entre las cuales se pueden incluir virus como Adenovirus y Parainfluenza 3, los cuales producen en forma general bronquitis y alveolitis; los virus respiratorios sincitiales, que ocasionan la rinitis focal y bronquitis catarral y por último se menciona al Reovirus tipo 1, el cual produce neumonía de tipo intersticial en corderos.^{14, 20, 42, 43, 53}

Entre los parásitos que se involucran en el aparato respiratorio y que pueden considerarse de importancia son *Dyctiocaulus sp.*, *Muellerius* y *Protostrongylus rufescens*.^{20, 38, 46, 53, 63}

De los agentes bacterianos considerados en las neumonías en ovinos, se mencionan como importantes a *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mycoplasma arginini* y *Mycoplasma conjunctivae*; pero sin duda, la de mayor importancia es *Pasteurella haemolytica*.^{5, 11, 13, 55, 59} Otras bacterias involucradas son *Pasteurella multocida*, *Branhamella sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, y ocasionalmente se pueden aislar estafilococos hemolíticos y coliformes a partir de neumonías atípicas.^{42, 46, 57}

Se ha reconocido que *P. haemolytica* y *P. multocida* son agentes que comúnmente se encuentran formando parte de la microbiota normal de los rumiantes.^{5, 9, 17} Esta asociación comensal es importante debido a que bajo ciertas condiciones de inmunosupresión en el huésped, como primoinfección por otros microorganismos, cambios de temperatura, humedad relativa alta y ventilación deficiente, afectan a los mecanismos de defensa inespecíficos lo que permiten la colonización de vías respiratorias bajas, causando daño al tejido pulmonar.^{1, 14, 38}

2.1 CARACTERISTICAS GENERALES.

Pasteurella multocida y *Pasteurella haemolytica* son bacilos o cocobacilos Gram negativos; tienen diversos tamaños, que varían de 0.3 - 1.0 por 1.0 - 2.0 μm .^{13, 39, 42} Se pueden observar solos, en empalizadas o cadenas cortas, son aerobios o anaerobios facultativos, son inmóviles, están capsuladas, no forman espora, son oxidasa positiva y muestran tinción bipolar, la cual es más manifiesta con las tinciones de Leishman o Wright;^{16, 19, 38} no producen hemólisis, excepto *P. haemolytica*, la cual se aprecia en placas de agar sangre de bovino (en ocasiones poco aparente), además de crecer en agar Mc Conkey.^{1, 7, 15, 16} *P. multocida* produce indol además de un olor característico en las placas, mientras que *P. haemolytica* no presenta éstas características.^{1, 7, 16, 17, 21, 39}

En agar sangre, crece a las 24 horas de incubación, las colonias son de tamaño variable, en general mide de 1 - 3 mm de diámetro,³⁹ su forma es redonda bien limitada, mucóide o rugosa y tiene un color grisáceo.^{16, 17, 19}

Los diferentes tipos de *Pasteurella multocida* que se han identificado en base a sus polisacáridos capsulares según Carter son 5 tipos: el A, B, D, E y F.¹⁶ El tipo A, es parte de la flora normal de tracto respiratorio de muchos animales domésticos, además a sido aislado de problemas neumónicos en diferentes especies y también es frecuentemente aislado del cólera aviar, el tipo B, no es comensal y es asociado con septicemia hemorrágica de rumiantes en Asia, Australia y Europa. El tipo D, es aislado más frecuentemente de neumonía y rinitis atrófica en cerdos, el tipo E, causa septicemia hemorrágica en rumiantes de Africa Central,^{13, 14, 16, 23} y finalmente aislado de pavos un nuevo tipo capsular denominado F, del cual aún no es claro el papel en la enfermedad.¹⁶

De los tipos antes mencionados de *P. multocida* el A y D se han aislado en México, estos son identificados a partir de la prueba de la descapsulación por hialuronidasa para el tipo A y precipitación de acriflavina para el tipo D.^{17, 21, 33}

Los factores de virulencia de *P. multocida* se asocian a la presencia de cápsula, que tienen como primer componente al ácido hialurónico; ésta puede ser responsable de la adherencia selectiva que muestran algunas bacterias hacia los diferentes sustratos, incluyendo a superficies inertes y células epiteliales y la formación de una toxina, la cual es un polipéptido dermonecrótico letal en ratones.^{17, 33}

Pasteurella haemolytica es un comensal de la nasofaringe, confinada casi exclusivamente a los rumiantes y la cual se asocia comúnmente a problemas neumónicos, por ser la bacteria más frecuentemente aislada de tejidos afectados.^{5, 9, 13, 17, 38} De acuerdo a la capacidad de reacción con la catalasa y a la fermentación de carbohidratos se dividen en dos biotipos, el biotipo A arabinosa y catalasa positivo y el biotipo T trehalosa positivo, catalasa negativo.^{1, 17, 18, 21, 48, 62, 69}

Esta clasificación además tiene importancia biológica; puesto que las cepas del biotipo A, son responsables de la neumonía en ovinos adultos y septicemia en corderos jóvenes, ^{4, 14, 17, 38} por otro lado las cepas del biotipo T, causan la forma comúnmente conocida como pasteurelosis septicémica en corderos postdestete, ^{13, 46, 59, 62} describiéndose también aislamientos positivos a partir de fosas nasales de borregos clínicamente sanos. ^{1, 6, 10, 13, 14, 17, 23, 48}

De acuerdo a los antígenos capsulares solubles, se han descrito 17 serotipos diferenciables mediante la técnica de hemoaglutinación indirecta o aglutinación rápida en placa, de los cuales para el biotipo A son el 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16 ⁵ 10, 11, 17 y 17, ⁶⁴ para el biotipo T son el 3, 4, 10, 15, ^{8, 10, 11, 24, 26, 55} Sin embargo ciertas cepas no son tipificables por éstos métodos. ^{1, 5, 9, 10, 13, 18, 23, 24, 25, 26, 38, 59, 61}

Acercas de los mecanismos que intervienen en el desarrollo del daño pulmonar causado por *P. haemolytica*, la mayoría de los autores coinciden en el efecto patológico de la leucotoxina y la endotoxina consideradas como los factores de virulencia más importantes, ^{17, 22, 52, 55, 65} otros factores de virulencia que también se han reconocido son una proteína de superficie, que liga solamente transferrina de rumiantes, dos tipos de fimbria, una grande y rígida de 12 nm de diámetro y otra flexible y pequeña de 5 nm de diámetro, la cápsula con propiedades antifagocíticas, de naturaleza polisacárida, que favorece la adhesión a superficies epiteliales y le confiere a cada serotipo sus características, la hemolisina y la neuroamimidasa. ^{22, 52, 65}

2.2 ASPECTOS MACROSCOPICOS Y MICROSCOPICOS.

La naturaleza de la neumonía causada por *Pasteurella spp* depende del grado de proliferación bacteriana, de la virulencia de la cepa y del nivel de defensa del hospedador, aunque hay tendencia a caracterizarse como neumonía intersticial fibrinosa aquella producida por *P. haemolytica* y como bronconeumonía exudativa o fibrinopurulenta a la relacionada con *P. multocida*. ¹³

Como se mencionó la neumonía causada por *P. haemolytica* se caracteriza por ser intersticial fibrinosa. Sin embargo se ha logrado aislar de cuadros neumónicos tanto de severidad, distribución y morfopatología variables, que van desde una neumonía supurativa focal y difusa, hasta cuadros de lesiones vasculares con trombosis y hemorragia. Esto puede ser posible debido a que puedan existir diferencias en las propiedades patogénicas de la bacteria.^{38,42}

En animales que han muerto por pasteurelisis neumónica hiperaguda, se encuentra exudado gelatinoso grisáceo sobre el pericardio y grandes cantidades de exudado pleural de color pajizo, mientras que los pulmones están agrandados, edematosos y hemorrágicos. Desde el punto de vista histológico hay necrosis alveolar difusa, edema de tabiques interlobulillares y en ovinos que sobreviven a la fase hiperaguda de la enfermedad se observan las llamadas células avenulares en zonas alrededor de los alveolos necrosados. En forma generalizada las lesiones principales se encuentran en la parte superior del aparato digestivo, torax e hígado y son además frecuentes las hemorragias subcutáneas en torax y cuello. Se observa por otra parte aumento de volumen de tonsilas y linfonodos faríngeos, así como ulceración y necrosis de faringe y esófago.^{14,38}

III. OBJETIVOS

-Aislar *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* de cavidad nasal de ovinos aparentemente sanos, pertenecientes a rebaños trashumantes de la zona de Xalatlaco, Estado de México.

-Identificar los tipos de *Pasteurella multocida* así como los biotipos y serotipos de *Pasteurella haemolytica*.

I V. MATERIAL Y METODOS

4.1 Recolección de muestras

Se efectuaron muestreos periódicos comprendidos de diciembre de 1995 a agosto de 1996, a 650 ovinos, de 6 rebaños diferentes, pertenecientes a sistemas de producción trashumante en el Municipio de Xalatlaco, Estado de México; recolectándose un total de 230 muestras de exudado nasal de animales aparentemente sanos, mediante hisopos estériles introduciéndolos y rotándolos en la parte profunda de la cavidad, una vez obtenidos se depositaron en tubos y se trasladaron en refrigeración para su procesamiento al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

4.2 Aislamiento de *Pasteurella spp.*

Cada muestra se sembró directamente del hisopo a las placas de agar sangre, adicionadas con un 7% de sangre de bovino e incubadas por 24 horas a 37 ° C. Transcurrido ese tiempo se procedió a separar por su morfología las colonias sospechosas de *Pasteurella spp.* una vez seleccionadas se resembraron bajo las mismas condiciones antes mencionadas para obtener un cultivo puro, se realizaron frotis de las colonias y se procedió a efectuar la tinción de Gram para observar sus características microscópicas y tintoriales.

Una vez seleccionados los cultivos puros, fueron sometidos a pruebas bioquímicas primarias y secundarias tales como motilidad, exhibición de la actividad de la oxidasa, catalasa, crecimiento en agar Mc Conkey, Oxido-Fermentación, producción de indol y producción de ácido a partir de diferentes carbohidratos siguiendo la metodología de Carter, Cowan y Mc Faddin. ^{7, 21, 40}

Todos los cultivos identificados como *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* fueron separados para su tipificación.

4.3 Tipificación de *Pasteurella multocida*

Las cepas de *P. multocida* fueron recapsuladas en ratones albinos, mediante la inoculación intraperitoneal de 0.2 ml de una suspensión de la bacteria en caldo infusión cerebro-corazón (BHI), realizándoles la necropsia a las 24 horas postinoculación y recuperándolas de hígado. Posteriormente se procedió a clasificar los tipos capsulares de *P. multocida*, mediante las pruebas de descapsulación por hialuronidasa para el tipo A y la precipitación de acriflavina para el tipo D.

Para la prueba de descapsulación por hialuronidasa se sembraron las colonias de *P. multocida* en placas de agar sangre sobre toda la superficie y después una estría central de *Staphylococcus aureus* productor de hialuronidasa, las cuales se incubaron a 37° C por 24 h. Aquellas cepas que mostraron un crecimiento de colonias mucoides en la proximidad a la estría de *S. aureus* y en el resto de la placa colonias mucoides se consideraron positivas a descapsulación y por consiguiente al tipo A.

Para la prueba de precipitación de acriflavina se inocularon cepas de *P. multocida* en tubos con caldo BHI, los que se incubaron por 24 h a 37° C, transcurrido éste tiempo se centrifugaron a 1200 x g durante 10 minutos; posteriormente se retiraron 2.5 ml del sobrenadante quedando 0.5 ml del sedimento bacteriano al que se le adicionó 0.5 ml de solución de acriflavina 1:1000, dejándolos reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se dió como positiva al observar la formación de un precipitado grueso de color anaranjado y por consiguiente al tipo D.

4.4 Tipificación de *Pasteurella haemolytica*.

La subclasificación en biotipo A y T se realizó en base a la producción de ácido a partir de arabinosa y trehalosa. Por lo que las cepas de *P. haemolytica* se sembraron por agitación en un medio que contenía :

- Peptona base 1.0 %
- Cloruro de Sodio 0.5 %
- Indicador de Andrade 1.0 %
- Carbohidrato a probar 1.0 %

Se dejaron en incubación por 24 - 72 h a 37° C, transcurrido este tiempo se consideraron positivos al aprovechamiento de los carbohidratos por la acidificación del medio el cual se tornaba a un color rosado. Correspondiendo los aislamientos arabinosa positivo al biotipo A y aislamientos trehalosa positivo al biotipo T.

4.5 Determinación de los serotipos capsulares de *Pasteurella haemolytica*

Los serotipos capsulares de *P. haemolytica* fueron determinados por la prueba de hemoaglutinación indirecta utilizando antiseros monoespecíficos de referencia y siguiendo la técnica sugerida por Frank en microplacas de titulación de 96 pozos.²⁴

Para esta prueba se utilizaron eritrocitos de sangre periférica desfibrinada de bovino que se almacenó por lo menos 7 días, pasado este tiempo se procedió a lavar los eritrocitos con solución salina fisiológica y centrifugándolos a 800 x g por 10 minutos varias veces hasta que se obtuvo un sobrenadante completamente claro, mismo que se decantó para obtener el paquete de eritrocitos.

Para preparar el antígeno (eritrocitos sensibilizados), se hizo crecer el aislamiento bacteriano a probar en tubos que contengan 7 ml de caldo BHI durante 18 h a 37° C en baño María en agitación continua. Posteriormente se inactivaron los cultivos elevando la temperatura a 56° C por 30 minutos, lo que favoreció a la liberación de antígenos capsulares solubles. Se agregaron 100 µl de eritrocitos previamente lavados e inmediatamente se incubaron en el baño por 1 h a 37 °C. Después se centrifugaron a 700 x g durante 5 minutos y se repitió una vez más, finalmente los eritrocitos sensibilizados se resuspendieron con 7 ml de solución salina fisiológica.

En placas de microtitulación de 96 pozos con fondo "U", se agregaron 25 µl de solución salina fisiológica. En cada pozo de la línea A de la placa se agregaron 25 µl de cada uno de los 16 antiseros monoespecíficos a probar y se realizaron diluciones dobles hasta la fila H. A cada pozo se le añadió 25 µl de eritrocitos sensibilizados con *P. haemolytica* del serotipo a probar y se incubaron de 1 a 2 h a 37° C. Al finalizar este periodo se realizó una primera

lectura y luego se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente para realizar una segunda lectura de las placas.

Los estudios serológicos se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR, el cual proporcionó los 16 antisueros de referencia, junto con cepas de referencia.

4.6 Análisis Estadístico.

Para el análisis de los porcentajes de aislamiento de *Pasteurella spp* se utilizó el programa G.L.M (General Lineal Models) del paquete estadístico S.A.S. (Statistical Analysis System).

V. RESULTADOS.

Se trabajaron 230 muestras de exudado nasal de 650 ovinos de 6 rebaños diferentes del Municipio de Nalatlaco, Estado de México, en un periodo comprendido de diciembre de 1995 a agosto de 1996, obteniéndose 46 aislamientos de *Pasteurella spp* (20 %), los cuales fueron examinados observando sus características de morfología bacteriana y reacción tintorial, además de las pruebas bioquímicas específicas realizadas como lo muestra el cuadro 1, donde se observa como los aislamientos se comportaron de acuerdo a lo previsto, es decir, compatibles con el género *Pasteurella spp* y a la vez permitió diferenciar por su actividad bioquímica a *P. multocida* de *P. haemolytica*, obteniéndose así 11 (23.9%) y 35 (76%) aislamientos respectivamente tal como se indica en la figura 1.

De los aislamientos de *P. multocida*, 3 (6.5%) correspondieron al tipo A y 8 (17.5%) al tipo D, mientras que de *P. haemolytica*, 8 (17.5%) fueron del biotipo A y 27 (58.7%) del biotipo T de acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas, tal como lo indican los cuadros 2, 3 y 4. Cabe señalar que se observó variabilidad en la fermentación de los carbohidratos en cuanto al biotipo T en donde xilosa presentó 7 aislamientos positivos y 20 negativos así como arabinosa 11 positivos y 16 negativos.

Otras pruebas que se realizaron para complementar la identificación *P. haemolytica*, se indican en el cuadro 5, donde cabe señalar que los resultados obtenidos descartaron a otros géneros de coccobacilos, además de que se puede observar como el 100% de los aislamientos fueron negativos para las pruebas de ureasa, hidrólisis de la gelatina y fenilalanina y 100% positivas en reducción del nitrato, notando solamente variabilidad en la producción de H₂S.

De los 35 aislamientos de *P. haemolytica*, sólo 27 fueron serotipificadas, debido a que de las 8 restantes, algunas no pudieron purificarse y otras no fueron recuperadas después de varios días de conservación. De aquellas probadas sólo 1 (3.7%) perteneció al biotipo A serotipo 6 y las 26 (96.3%) restantes fueron no tipificables utilizando H1A.

El porcentaje obtenido de *Pasteurella* spp. por mes fue: diciembre 40%, enero 33%, febrero 15%, marzo 25%, abril 6%, mayo 15.7%, junio 22% y agosto 10.2%, observandose diferencias estadísticamente significativas entre diciembre 40% y enero 33% con abril 6% y agosto 10% ($P < 0.05$) como se muestra en la figura 3.

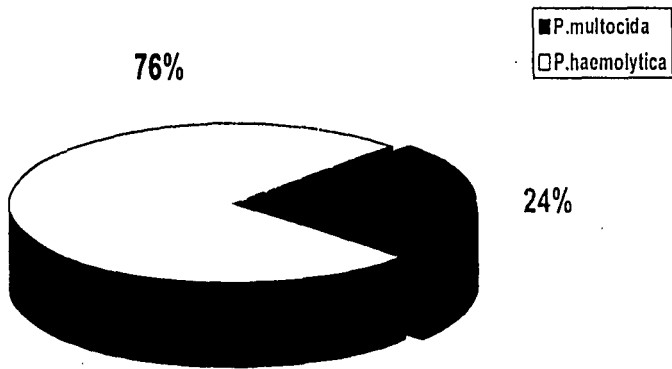


Figura 1. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS DE *Pasteurella* spp.

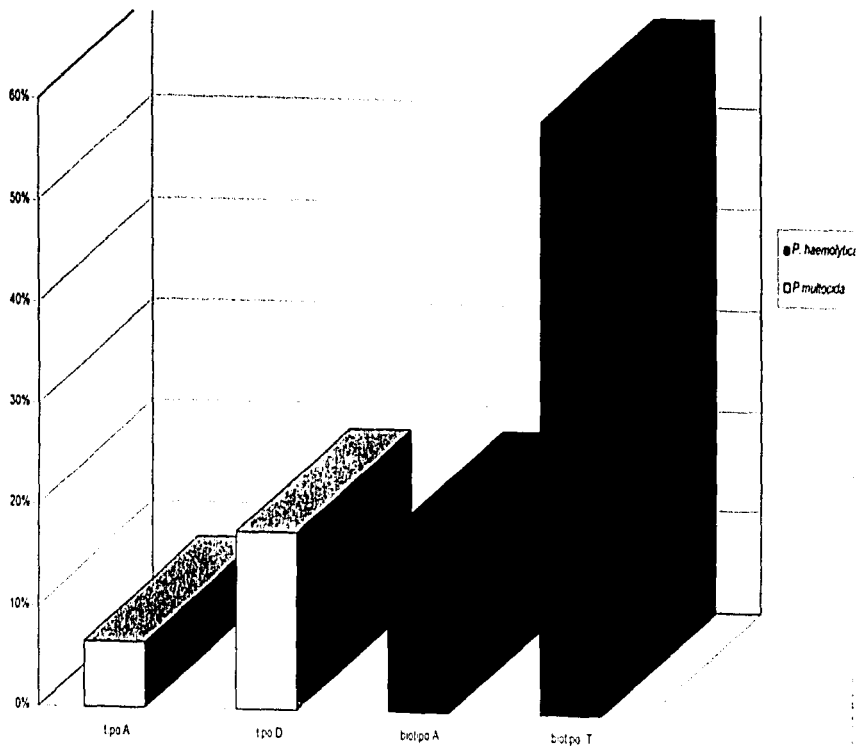


Figura 2. PORCENTAJE DE AISLAMIENTO DE LOS TIPOS DE *P. multocida* Y BIOTIPOS DE *P. haemolytica*.

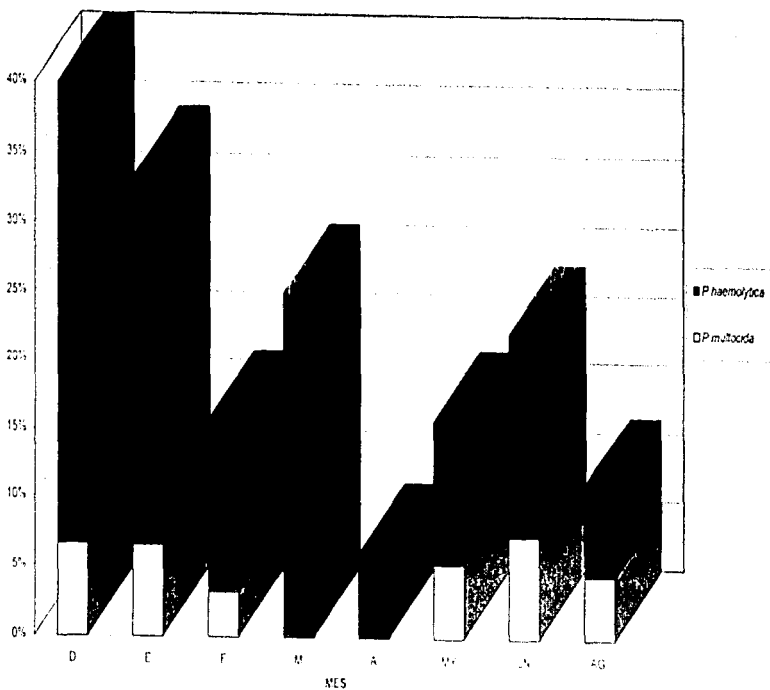


Figura 3. PORCENTAJE DE AISLMIENTOS DE *Pasteurella* spp POR EPOCA DEL AÑO EN JALATLACO, ESTADO DE MEXICO

Cuadro 1. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA *Pasteurella spp.*

FORMA	COCOBACILO
GRAM (-)	46/46 (100%)
HÉMOLISIS (+)	35/46 (76%)*
OXIDASA (+)	46/46 (100%)
CATALASA (+)	23/46 (50%)
O/F	F46/46 (100%)
PRODUCCION DE INDOL	11/46 (26.1)
PRODUCCION DE ACIDO	
A PARTIR DE:	
GLUCOSA	46/46 (100%)
RAFINOSA	29/46 (63%)
MALTOSA	33/46 (72%)
XILOSA	21/46 (46%)

*Sólo aparente al quitar la colonia o después de varios días.

CUADRO 2. MODELO DIFERENCIAL DE LOS TIPOS A Y D DE *Pasteurella multocida*.

No. de cepas probadas de <i>Pasteurella multocida</i> n=11		A	D
Tipos			
Pruebas bioquímicas:			
HIALORUNIDASA positivo		3/11	0/11
%		6.5	0
ACRIFLAVINA positivo		0/11	8/11
%		0	17.5

Cuadro 3. REACCION FERMENTATIVA DE CARBOHIDRATOS PARA EL TIPO A Y D DE *Pasteurella multocida*

No. de cepas probadas	3	8
Tipos	A	D
Prod. de ácido a partir de:		
Glucosa	3	8
%	100	100
Xilosa	1	7
%	33.3	87.5
Lactosa	3 -	8 -
%	100	100
Maltosa	3 -	8 -
%	100	100
Rafinosa	3-	7 -
%	100	87.5
Trehalosa	1	8
%	33.3	100

(-) Reacción negativa al carbohidrato.

Cuadro 4. DIFERENCIACION DE LOS DOS BIOTIPOS A Y T DE *Pasteurella haemolytica* MEDIANTE LA REACCION FERMENTATIVA DE LOS CARBOHIDRATOS.

No. de cepas probadas.	8	27
Biotipos	A	T
Prod. de ácido a partir de:		
Glucosa	8	27
%	100	100
Xilosa	6	20-
%	75	74.1
Maltosa	7	26
%	87.5	96.3
Lactosa	6-	27
%	75	100
Rafinosa	7-	27
%	87.5	100
Arabinosa	7	16-
%	87.5	59.3
Trehalosa	8-	24
%	100	88.9

Cuadro 5. OTRAS PRUEBAS BIOQUIMICAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACION DE *Pasteurella haemolytica*

No. de cepas probadas	8	27
Biotipos	1	7
Pbas. bioquimicas		
Prod. de H ₂ S		
(tiras de Ac. Plomo)	3	17
%	37.5	63
Ureasa	8-	27-
%	100	100
Hidrol. de la Gelatina	8-	27-
%	100	100
Reduc. del Nitrato	8	27
%	100	100
Fenilalanina	8-	27-
%	100	100

VI. DISCUSION

Para el presente trabajo los resultados obtenidos de 230 muestras fueron 24 % de *P. multocida* y 76 % de *P. haemolytica*, lo que coincide con diversos autores, los cuales mencionan que *P. haemolytica* es aislada en mayor porcentaje que *P. multocida*, en ovinos.^{5, 9, 13, 14, 20, 34, 38, 43, 44, 63, 67}

De acuerdo a la prevalencia de *Pasteurella spp* se encontró en los meses de diciembre y enero un alto porcentaje de aislamiento del 40 % y 33 % respectivamente, en comparación con abril y agosto los cuales tuvieron un 6 % y 10 %. Esto indica que el mayor número de aislamientos de *Pasteurella spp* aisladas coincide con época de clima frío. Sin embargo cabe señalar que en los meses restantes también se logró obtener un aislamiento constante e importante debido a que pudiera existir variación y correlación entre permanencia en un determinado lugar y época del año de acuerdo al sistema trashumante.

Se encontró un mayor número de cepas del tipo D que del A de *P. multocida*, hecho que se contradice con lo mencionado por algunos autores,^{13, 30, 36, 37} en donde la mayoría de los aislamientos de cavidad nasal y pulmones neumónicos pertenecen al tipo capsular A. Otros autores han aislado más cepas del tipo D, parecido a lo encontrado en el presente trabajo, por ejemplo, Radillo (1987) aisló un 55 % de este tipo en ovinos, mientras que Martínez (1991) encontró un 100 % de aislamiento en pulmones neumónicos de corderos. Existe poca información sobre el porque de los cambios de incidencia, pudiera pensarse que éste dato este relacionado con la adherencia bacteriana hacia las células epiteliales de cavidad nasal, tal como menciona Ruz (1989), donde observó que existe una mayor tendencia en la adherencia de aislamientos de *P. multocida* tipo D que las del tipo A a células respiratorias de conejo portadores en comparación con los no portadores. Esto puede estar relacionado con el tipo de cápsula, de hecho otros autores mencionados por Ruz (1989) han hecho notar que la cápsula del tipo A reduce la adherencia, quizá por su alta densidad de cargas que repele más a la bacteria de la célula animal o que la cápsula enmascara parcialmente la adhesina o ambas cosas.⁵⁸ De este modo podríamos considerar que los resultados del presente trabajo de *P. multocida* estén relacionados de la misma forma en los ovinos de la región de Xalatlaco; sin embargo, es conveniente realizar nuevos estudios para confirmar o descartar esta posibilidad.

En el caso de *P. haemolytica*, la mayoría de los autores coinciden que es más frecuente el aislamiento de cavidad nasal del biotipo A, que frecuentemente esta relacionado con neumonía y septicemia en corderos jóvenes y menos o nulo el biotipo T que causa septicemia en corderos postdestete,^{4, 6, 9, 13, 34, 36, 56, 61} encontrándose más de este último en el presente estudio. Sin embargo, Mwangota *et al.* (1978), en un estudio realizado en Kenya aislaron 10.2 % de *P. haemolytica* biotipo T, siendo éste más frecuentemente aislado de cavidad nasal de cabras y borregos aparentemente sanos y no de septicemia en corderos.⁴⁸ En Francia, Sanchis *et al.* (1989), encontraron 17 % de aislamiento del biotipo T de neumonías de pequeños ruminantes.⁴⁸

En México, Martínez (1991) aisló una cepa del biotipo T serotipo 10 de pulmón neumónico de cordero, mientras que Morales *et al.* (1994) encontraron 2 cepas, ambas del serotipo 10, una de ellas recobrada de exudado nasal y la otra de pulmón neumónico. También Martínez (1995) encontró un 51.3 % de *P. haemolytica* biotipo T de exudado nasal de sementales ovinos, identificadas sólo por pruebas bioquímicas.^{43, 44, 45} Lo anterior nos indica, que la variación de los biotipos de *P. haemolytica* se deba a la constante competencia que existe entre éstos en la nasofaringe; por lo que se sugiere que el alto porcentaje de aislamientos del biotipo T en Xalatlaco, se deba a que están mejor adaptadas tanto al hospedador como a los factores que lo rodean y por lo tanto ser más frecuente en esta zona, dado que existen variaciones en cuanto a especie y tipos de *Pasteurella spp.*, tanto por zonas como por época del año.

Los resultados de aislamientos del biotipo T en la región de Xalatlaco confirma su presencia en México, siendo necesaria la investigación en cuanto a la relación que pudiera existir entre este biotipo y la presentación de neumonías, debido a que en el presente trabajo no fue evaluado ya que no era parte de los objetivos. Además cabe señalar la importancia de que este biotipo pudiera estar involucrado en muertes repentinas de los animales.

En el presente trabajo sólo se logró serotipificar una cepa de *P. haemolytica* biotipo A, serotipo 6, obteniéndose a la vez un alto índice de cepas no tipificables por hemoaglutinación indirecta (HAI) utilizando 16 antisueros mono-específicos, en comparación con lo observado por otros autores, que varía de 7 % al 30 % de aislamientos no tipificables. 2, 6, 13, 18, 50, 54 Sin embargo, otros autores como Mwangota *et al.* (1987), observaron un 42 % de cepas no tipificables utilizando 12 antisueros mono-específicos y de éstas el 95.4 % fueron recuperadas de cavidad nasal de rumiantes, así mismo Martínez (1991), encontró un 56.2 % de aislamientos no tipificables de pulmones neumónicos de corderos, utilizando 12 antisueros mono-específicos. 44 48 Por otro lado Biberstein *et al.* (1960), mencionan que de 18 cepas no tipificables, 12 fueron recuperadas de cavidad nasal de animales aparentemente sanos, así mismo en otro estudio obtuvieron 39.4% cepas no tipificables utilizando sólo 11 antisueros, aisladas de cavidad nasal de ovinos aparentemente sanos y Sanchis *et al.* (1989) obtuvieron 27.8% de cepas no tipificables utilizando 15 antisueros mono-específicos, la mayor parte fueron recuperadas de nasofaringe de ovinos y caprinos. 8, 9, 48

Los resultados obtenidos sugieren que existe una posible relación entre los aislamientos de cavidad nasal de animales aparentemente sanos con la no tipificación por HAI y que a la vez pudieran ser patógenas o no patógenas según la edad de los animales. 4, 44 31 Además de que pudieran involucrarse otros factores con la no tipificación, tales como el grado de especificidad y sensibilidad de la prueba. 23, 27 Por ejemplo Gilmour *et al.* (1985), observaron al microscopio electrónico protuberancias irregulares en la superficie, lo que pudiera reflejar distintas fases de crecimiento y por lo tanto causar variaciones antigénicas que impidan la tipificación por métodos ya establecidos. 32 Por lo que se sugiere utilizar pruebas como la contraelectroforesis, donde según Donachie *et al.* (1984), encontraron dentro de un grupo de cepas HAI negativas, 9 diferentes serogrupos y según Frank (1980), existen por lo menos 15 serotipos que no pueden ser tipificados usando HAI, 23, 25 debido a esto los aislamientos del presente estudio podrían caer dentro de éstos serogrupos y serotipos nuevos no tipificados por HAI. Por lo tanto cabe señalar que los 35 aislamientos identificados como *P. haemolytica* se comportaron de acuerdo a las reacciones bioquímicas esenciales del género, 10, 17, 19, 21, 39 es decir, que todos tuvieron un escaso crecimiento en Mac Conkey.

reacción a la oxidasa, reacción a la catalasa para el biotipo A, no así para el biotipo T; la mayoría presentaba hemólisis observable al quitar la colonia del agar o bien después de varios días a 4° C, así mismo fueron negativas a la motilidad, a la producción de indol, a ureasa, fenilalanina, licuefacción de la gelatina y fueron comúnmente variables a producción de H₂S; sin embargo, esta diferencia se apreció más en aquellos aislamientos sugeridos como *P. haemolytica* biotipo T.

Un factor imprescindible que sirvió para obtener mayor confiabilidad al respecto fue la producción de ácido a partir de los azúcares arabinosa y trehalosa, lo que marcaron la diferencia entre éstos 2 tipos, tal como lo sugieren diversos autores. ^{1, 10, 17, 19, 21, 39, 48, 62, 69}

VII. CONCLUSIONES.

-De las muestras recolectadas se obtuvo un mayor número de aislamientos de *P. haemolytica* que de *Pasteurella multocida* y a la vez fueron aislados los 2 tipos y biotipos de ambas especies, por lo tanto estos resultados deben de tomarse en cuenta en la elaboración de autobacterinas para prevenir y controlar posibles brotes de la enfermedad debido a que es frecuente el aislamiento de *Pasteurella spp* de ovinos en la zona de Xalatlaco, bajo el sistema trashumante.

-Lo aislamientos de *P. haemolytica* biotipo T, son frecuentes en la región de Xalatlaco, y se hace necesaria la investigación en cuanto a la relación que pudiera existir entre este biotipo y la presentación de neumonías.

-En los porcentajes de aislamiento por mes se encontró un mayor índice de *Pasteurella spp.* en los meses de diciembre y enero coincidiendo con la época de clima frío, por lo tanto se hace énfasis hacia el manejo sanitario en estos meses, para prevenir enfermedades de tipo respiratorio.

-De los aislamientos de *P. haemolytica* sometidos a la prueba de HAI, se obtuvo un alto porcentaje de cepas no tipificables, aunque la fermentación de los azúcares y otras pruebas bioquímicas aportaron la confirmación de las características de *P. haemolytica*, se sugiere sean probadas con nuevas técnicas más sensibles, debido a que dentro de éste tipo de aislamientos se podrían encontrar nuevos serotipos, además de ser necesario que se involucren otros grupos de investigación.

VIII. LITERATURA CITADA

- 1.-Aarsleff, E.L., Biberstein, E. L., Shreeve, B.J. : A study of untypable strain of *Pasteurella haemolytica*. *J. Comp. Path.* 80 : 493-498 (1970).
- 2.-Aguilar, R.F., Jaramillo, J., Trigo, F.J.: Serotipos de *Pasteurella haemolytica* a partir de pulmones neumónicos de bovinos. *Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaría*. Fac. de Med. Vet. U.N.A.M. México D.F. S.A.R.H-U.N.A.M. (1985).
- 3.-Aguilar, R. F. : Evaluación de la protección contra la pasteurelisis neumónica, en corderos vacunados con diferentes antígenos de *Pasteurella haemolytica* A1. Tesis Maestría. U.N.A.M. México (1996).
- 4.-Al -Sultan, I.I. and Aitken, I.D. : The tonsillar carriage of *Pasteurella haemolytica* in lambs. *J.Comp. Path.* 95 (1985).
- 5.-Alley, M.R., Quinlan, J.R. and Clarke, J.R. : The bacterial flora of the respiratory tract of normal and pneumonic sheep. *N. Z. Vet. J.* 23: 113-118 (1975).
- 6.-Argueta, G.L : Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* U.N.A.M. (1986).
- 7.-Beck, G., Cords, G.B. and Hennam, H.A. : Factors in disease and mortality of lambs. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 71 : 84-91 (1976).
- 8.-Biberstein, E.L. , Gills, M., Knight, H. : Serological types of *Pasteurella haemolytica*. *Cornell Vet.* 50 : 283 (1960).
- 9.-Biberstein, E.L., Shreeve, B.J. and Thompson, D.A. : Variation in carrier rate of *Pasteurella haemolytica* in sheep flocks. *J. Comp. Path.* 80 (1970).
- 10.-Biberstein , E. L. : Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In *Methods in Microbiology*. Edited by Bergan, T. And Norris, J.K. 10: 253-269. *Academic Press* , New York.

- 11.-Biberstein, E.L., Chung, Z.Y. : Review of Veterinary Microbiology. *Blackwell Scientific Publication*, USA. (1990).
- 12.-Beck, G., Cords, G.B. and Hennam, H.A. : Factors in disease and mortality of lambs. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 71: 84-91, (1976).
- 13.-Blanco, V. F. : Serotipos de *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones neumónicas en ruminantes domésticos. Tesis Maestría. *Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M.* México, D.F., (1990).
- 14.-Blood, D.C. y Radostits, O. M. : Medicina Veterinaria. 7a. ed. *Interamericana*. México, (1992).
- 15.-Burrells, C., Evans H. B. And Dawson, A. Mc L. : Antigenic relationships between the serotypes of *Pasteurella haemolytica* demonstrable by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *Vet. Microbiol.* 8: 187-198 (1983).
- 16.-Carter, G.R. : Bacteriología y Micología Veterinarias : Aspectos Esenciales. *El Manual Moderno*, México, (1985).
- 17.-Carter, G.R. and Chengappa, M.M. : Essentials of Veterinary Bacteriology and Micology. Fourth edition. *Lea and Febiger*. Philadelphia London (1991).
- 18.-Colin , R.R. *et al.* : Serotipos de *Pasteurella haemolytica* Aislados de Pulmones Neumónicos de Ovinos de México. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 29 (3) (1987).
- 19.-Cottral, G.E. : Manual de Métodos Estandarizados en Microbiología Veterinaria. *La Prensa Médica Mexicana S.A.*, México, (1986).
- 20.-Council British. : Manejo y Enfermedades de las Ovejas. *Acribia* , Zaragoza, España . (1982).
- 21.-Cowan, S.T. : Manual for the Identification of Medical Bacteriana. 2a. ed. *Cambridge University Press*, (1974).

- 22.-Chidambaram, M. *et al* : Isolation of *Pasteurella haemolytica* leucotoxin mutants. *Infect. Imm.* 63:3 (1995).
- 23.-Donachie, W., Fraser, J., Quire, M., Gilmour, N.J.L. : Studies on strains of *Pasteurella haemolytica* not typable by the indirect haemagglutination test. *Res. Vet. Sci.* 37 : 188-197 (1984)
- 24.-Frank, G.H. and Wessman, G.E. : Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 7: 142-145 (1978)
- 25.-Frank, G.H. : Serological groups among untypable bovine isolates of *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 12: 579-582 (1980).
- 26.-Fraser, J., Laird, S. and Gilmour, N.J.L. : A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res. Vet. Sci.* 32: 127-128 (1982).
- 27.-Filion, L.G., Cho, H.I., Shewen, P.E., Raybould, T.J. and Wilkie, B.N. : Comparison of serological techniques measure antibody to *Pasteurella haemolytica* A1. *Can. J. Comp. Med.* 49: 99-103 (1985).
- 28.-Fodor, L., Amtsberg, G. and Varga, J. : Serotyping *Pasteurella haemolytica* strains with indirect haemagglutination double diffusion and counter immunoelectrophoresis. *Deutsche Tierärztliche wochenschrift.* 95: 1 (1988).
- 29.-Galina, H. M.A. : Enfermedades de los Pequeños Ruminantes. *Agrosistemas*, México (1995).
- 30.-García, E.H., Trigo, T.F., Sánchez-Mejorada, H., Aguilar, R.F. : Serotipos de *Pasteurella multocida* en bovinos productores de carne en México. *Vet. Méx.* 19: 199-203 (1988).
- 31.-Gentry, M.J., Confer, A. W. and Holland, S.G. : Comparison of the toxic and antigenic properties of single bovine isolated of *Pasteurella haemolytica* representing five serotypes and untypable strain. *Vet. Microbiol.* 16 : 351-367. (1988).
- 32.-Gilmour, N.J., Menzies, J.D., Donachie, W. and Fraser, J. : Microscopy of the surface of *Pasteurella haemolytica*. *J. Med. Microbiol.* 19: 25-34 (1985).

- 33.-Gutierrez, P.J.A., Smith, E. Determinación de la presencia de Ácido hialurónico en el Material Capsular de Cepas de *Pasteurella multocida* Tipos A y D Aisladas de Pulmones de Cerdos. *Vet. Méx.* 24 (2) (1993).
- 34.-González, R.C. : Aislamiento y caracterización parcial de *Pasteurella spp.* de cuadros neumónicos en bovinos y ovinos. Tesis Licenciatura. *F.E.S.C. U.N.A.M.* (1997).
- 35.-Hernandez, C.D. : Causas mas frecuentes de mortalidad en corderos en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (COPEA). Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. Zoot. U.N.A.M. México, D. F.* (1984).
- 36.-Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F. y Trigo, T.F. : Distribución de tipos de *Pasteurella multocida* en neumonías en becerros. *Memorias de la Reunión anual de Investigación Pecuaria en México.* SARH. Mexico, D.F. (1986).
- 37.-Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F. y Trigo, T.F. : Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. *Vet. Mex.* 18: 185-187 (1987).
- 38.-Jensen, R. L. : Diseases of Sheep. 3a ed. *Lea and Feiger, USA,* (1988).
- 39.-Krieg, N.R. and Holt, J.G. : Bergey's Manual of Sistemic Bacteriology. Vol. 1. *Williams and Wilkins.* London, England (1984).
- 40.-Mac. Faddin , J. F. : Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. *Panamericana.* Buenos Aires, Argentina, (1991).
- 41.-Malone, F.E., MC Parland, P.J. and O'Hagan, J. : Causes of mortality in an intensive lambs fattening unitl. *Irish Vet. J.* 39: 86-90 (1985).
- 42.-Martin, W.B. : Enfermedades de la Oveja. *Acribia,* Zaragoza, España, (1988).
- 43.-Martinez, J. R. : Identificación de *Pasteurella haemolytica* a partir de exudado nasal de sementales ovinos y determinación de susceptibilidad a diferentes antibióticos en el Edo. de México. Tesis Licenciatura . *F.E.S.C. U.N.A.M.* (1996).

- 44.-Martinez, R. H. : Mortalidad perinatal en corderos del Estado de México: Principal etiología bacteriana. Tesis Maestría. *F.E.S.C. U.N.A.M.* (1991).
- 45.-Morales, A. J. F.; Jaramillo, M. L.; Aguilar, R.F.; Trigo, T. F. : Primer informe en México de la presencia de *Pasteurella haemolytica* biotipo T en corderos. *Memorias Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*. Acapulco, México (1994).
- 46.-Moreno, C.B., Tortora, J.: Revisión de los Factores y las Causas de la Mortalidad de Corderos. *Memorias del curso de Actualización de Ovinos*. Toluca, México (1994).
- 47.-Murphy, G. L., Whitworth, L.C., Clinkebeard, K.D. : Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Imm.* 63:8 (1995).
- 48.-Mwangota, A.U.; Muhammed, S.I. and Thomson, R.G.: Serological types of *Pasteurella haemolytica* in Kenya. *Cornell Vet.* 68 : 84-93 (1978).
- 49.-Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. : Clinical Veterinary Microbiology. *Wolfe*. London, England. 1994.
- 50.-Quirie, M., Donachie, W., Gilmour, N.J.L. : Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet. Rec.* 119: 93-94 (1980).
- 51.-Pegram, R.G., Roeder, P.L. and Scott, J.M.: Two new serotypes of *Pasteurella haemolytica* from sheep in Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 11: 29-30 (1979).
- 52.-Petras, S. T. *et al* : Antigenic and virulence properties of *Pasteurella haemolytica* leucotoxin mutants. *Infect. Imm.* 63: 3 (1995).
- 53.-Pijoan, P. , Tortora, J. : Enfermedades de los Ovinos y los Caprinos. *F.E.S.C. UNAM*, (1986).
- 54.-Radillo, R.R. : Identificación de *Pasteurella multocida* tipo D en aparato respiratorio de ovinos. Tesis Licenciatura . *F.E.S.C. U.N.A.M.* (1987).
- 55.-Ramirez, R. R. y Brodgen, K.A., : Patogénesis del daño pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37 : 353-365 (1995).

- 56.-Richards, A.B. *et al* : *Pasteurella haemolytica* bacteriophage : Identification partial characterization an relationship of temperate bacteriophages from isolates of *Pasteurella haemolytica* (biotype A serotype 1). *Ann. J. Vet. Res.* 45 : 5 (1985).
- 57.-Rimler, R. B.: Presumptive Identification of *Pasteurella multocida* Serogroups A, D and F by Capsule Depolymerisation With Mucopolisacaridases. *Vet. Rec.* 134. (1994).
- 58.-Ruz, B. L. F. : Adherencia específica in vitro de cepas de *Pasteurella multocida* a células del tracto respiratorio superior del conejo. Tesis Maestría. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.*
- 59.-Sanchis, R., Abadie, G. and Polveroni, G.: Typing *Pasteurella haemolytica*. Study of 115 strains isolated from sheep and goats. *Recl. Méd. Vet.* 165:2 129-133 (1989).
- 60.-Shreeve, B.J., Ivanov, I.N. and Thompson, D.A. : Biochemical reaction of diferent serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *J. Med. Microbiol.* 3: 356-358 (1970).
- 61.-Shreeve, B.J. and Thompson, D.A. : Studies on the carriage of *Pasteurella haemolytica* in lambs. *J. Comp. Pathol.* 80 (1970).
- 62.-Smith, G.R.: The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 81: 431-440 (1961).
- 63.-Smith, M.C. and Sherman, M.D. : Goat Medicine. *Lea and Febiger*, USA. (1994).
- 64.-Stamp, J.T., Wat, J.A.A. and Tholinson, J.L. : *Pasteurella haemolytica* septicemia in lambs. *J. Comp. Pathol.* 65 : 183-196 (1955).
- 65.-Straus, D.C., Jolley, W.L. , Purdy, W. C. : Characterization of neuraminidasa produced by various serotypes of *Pasteurella haemolytica* . *Infect. Imm.* 61 : 11 (1993).
- 66.-Suarez, M.M. : Evaluación de los títulos de anticuerpos específicos contra diferentes inmunógenos de *Pasteurella haemolytica* en corderos de madres inmunizadas en tercer tercio de gestación. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* U.N.A.M (1990).
- 67.-Trigo, T.F. y Romero, M. J., : La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. *Vet. Méx.* 17: 116-119 (1986)
- 68.-Trigo, T. F. : El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos. *Memorias del Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*. Acapulco, México (1994).
- 69.-Younan, M.N. : Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A 17). *Res. Vet. Sci.* 58: 98 (1995).