



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

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

**Caracterización epidemiológica de los serotipos y genotipos de  
*Mannheimia haemolytica* en bovinos de dos cuencas lecheras de México.**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**CARLOS JULIO JARAMILLO ARANGO**

**TUTOR:**

FRANCISCO JOSÉ TRIGO TAVERA

**COMITÉ TUTORAL:**

FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

VÍCTOR TENORIO GUTIÉRREZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Agradecimientos**

Al Comité tutorial: Dr. Francisco José Trigo Tavera, Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez por el apoyo y la orientación permanentes.

Al Jurado: Dr. Francisco José Trigo Tavera, Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez, Dra. Susana Mendoza Elvira, Dr. Alejandro De la Peña Moctezuma, por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro, por su asesoría, enseñanza y orientación permanentes y sin condiciones.

A los Drs. Franciso Aguilar Romero y José Juan Martínez Maya, y la QFB. MC. Laura Jaramillo Meza, por su asesoría y apoyo en la realización de esta tesis.

A los MVZ's Rafael Soto Castor y Ramón Alfredo Delgado González, y a los ganaderos de del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hgo. y de la Cuenca Lechera de La Laguna, Torreón, Coah. y Gómez Palacio, Dgo., por el apoyo brindado para el éxito en los muestreos y el logro de los objetivos de esta tesis.

A los (las) MVZ's. José Luis de la Rosa R, Lucio I González F, Víctor M Campuzano O, Dinora Flores G, Ma. Guadalupe Machado, Elsa Urquiza, Yésica Flores S, Yara I Cruz M, Abril Morales A, María Luisa Samaniego B, y los PMVZ. José Luis Contreras J, y Alma D. González R, por su valiosa colaboración para el logro de los objetivos de este proyecto.

A los Dres. G.H. Frank y B. Briggs, National Animal Diseases Center, United States Department of Agriculture, por la donación de las cepas y los antisueros monoespecíficos de referencia, de *M. haemolytica* y *P. trehalosi*.

Al personal del laboratorio de brucelosis y tuberculosis del Depto. de Microbiología e Inmunología, de la FMVZ, UNAM, por el apoyo y la amistad que me brindaron.

Al laboratorio de bacteriología del CENID-MICROBIOLOGÍA-INIFAP en Palo Alto, al Depto. de Microbiología e Inmunología, al Depto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, la Unidad Administrativa y el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), de la FMVZ, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de esta tesis a través del Proyecto CONACyT G38590-B.

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Capítulo I</b> Introducción General	<b>3</b>
<b>Capítulo II</b> Epidemiología del complejo respiratorio bovino	<b>11</b>
<b>Capítulo III</b> Prevalence of <i>Mannheimia haemolytica</i> isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico	<b>42</b>
<b>Capítulo IV</b> Characterisation of <i>Mannheimia</i> spp. strains isolated from bovine nasal exudates and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico.	<b>60</b>
<b>Capítulo V</b> Characterisation of <i>Mannheimia</i> spp. and <i>P. multocida</i> strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico.	<b>80</b>
<b>Capítulo VI</b> Genotypic characterization of <i>Mannheimia</i> spp. strains isolated from nasal exudates of bovines from dairy farms in Mexico	<b>99</b>
<b>Capítulo VII</b> Discusión General	<b>116</b>
<b>Capítulo VIII</b> Conclusiones	<b>130</b>
<b>Capítulo IX</b> Perspectivas de la investigación	<b>133</b>
<b>Referencias</b>	<b>143</b>

## Resumen

Se realizó la caracterización epidemiológica, mediante la fenotipificación y genotipificación de cepas de *Mannheimia* spp., aisladas de exudado nasal de bovinos sanos y enfermos de neumonía de dos complejos lecheros, y de pulmones neumónicos de dos rastros municipales de México. La fenotipificación se realizó mediante métodos de cultivo *in vitro*, pruebas bioquímicas e inmunológicas; la genotipificación se realizó mediante ribotipificación. La mayoría de los aislamientos fueron no tipificables, entre los aislamientos serotipificables la mayoría fueron del serotipo 1. Las diferencias entre las frecuencias de aislamientos de los serotipos de *M. haemolytica* en los bovinos sanos y enfermos, en los complejos y en ambos rastros, fueron significativas. La tasa de prevalencia aparente de *M. haemolytica* fue mayor en bovinos sanos que en enfermos, estas diferencias fueron significativas. Los animales enfermos y los menores de un año fueron los de mayor frecuencia de aislamientos de *M. haemolytica*. Se identificaron diez patrones de ribotipos. La mayoría de los aislamientos se agruparon en un cluster en el ribotipo 1 y correspondieron al serotipo 1. Hubo más de un ribotipo para los serotipos de *M. haemolytica* y para *M. glucosida*; ningún ribotipo fue común para los serotipos de *M. haemolytica* o entre estos y *M. glucosida*. Esto indica que la mayoría de las cepas conforman un solo cluster, independientemente de su origen, y todas hacen parte del género *Mannheimia*. Los resultados contribuyen a la descripción de la epidemiología molecular, y a establecer y orientar estrategias más eficaces de prevención y control de la manheimiosis bovina.

## **Abstract**

*Mannheimia* spp. strains obtained from bovine nasal exudates of healthy and pneumonia sick bovines from two dairy complex, and from pneumonic lungs which were obtained in two slaughterhouses in Mexico, were characterized by means of phenotyping and genotyping. Strains were isolated and typified through *in vitro* culture, as well as biochemical and immunological tests; genotyping was carried out by means of ribotyping. Most of the isolates were not-typable, but among serotypable isolates most of them were serotype 1. The differences among the frequencies of the *M. haemolytica* serotypes isolates in the healthy and sick bovines, the complex and both slaughterhouses, were significant. The apparent prevalence rate of *M. haemolytica* was greater in healthy than in sick bovines, these differences were significant. The sick animals and those younger than one year of age were the groups with highest frequency of *M. haemolytica* isolates. Ten ribotype patterns were identified. Most of isolates were grouped in one cluster in ribotype 1 and corresponded to serotype 1. There were more than one ribotype for the *M. haemolytica* serotypes and for *M. glucosida*, but not ribotype was common for *M. haemolytica* serotypes or between these and *M. glucosida*. This indicates that most strain forming only one cluster, independently from their origin and all are part of the *Mannheimia* genus. The results contribute to the description of the molecular epidemiology, and to establish and to orient more effective strategies of prevention and control of the bovine mannheimiosis.

# **CAPÍTULO I**

## **Introducción General**

## **Introducción General**

### **1. Antecedentes**

El complejo respiratorio bovino es una de las principales causas de pérdidas en la industria ganadera bovina del mundo; se calcula que representa el 30% de la mortalidad total en bovinos y al menos el 1% en las ganaderías de engorda, y está relacionada con pérdidas económicas por más de 1 billón de dólares tan sólo en Norte América (Burrows *et al.*, 1993; Highlander, 2001; Lo RYC, 2001; Narayanan *et al.*, 2002).

El género *Pasteurella* está conformado por un amplio grupo de especies de bacterias que se entrecruzan en sus características fenotípicas y genotípicas, por lo que desde hace varios años se han realizado investigaciones con el propósito de clasificarlas adecuadamente.

A finales de la década de los 90, los serotipos de *P. haemolytica* A fueron reclasificados en el nuevo género *Mannheimia* mediante estudios de ribotipificación, electroforesis de enzimas multi-locus, secuenciación del gen 16S del RNAr e hibridación ADN-ADN, de tal manera que los anteriores serotipos A de *P. haemolytica* (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16 y 17) fueron renombrados como *Mannheimia haemolytica* (Mh). El serotipo A11 restante, el cual no está relacionado con Mh se renombró como *M. glucosida* (Mg). (Angen *et al.*, 1999a; Highlander, 2001; Lo RYC, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005).

En el Capítulo II se presenta una amplia revisión bibliográfica sobre este microorganismo.

Diversos estudios realizados en México desde la década de los 80, demuestran que los serotipos de mayor importancia, por su frecuencia en pulmones neumónicos o en animales clínicamente sanos, son el 1 y el 2 en bovinos, y el 1, 2, 5 y 9 en ovinos (Colin *et al.*, 1987; Argueta *et al.*, 1988; Blanco *et al.*, 1993; Blanco-Viera *et al.*, 1995; Pijoan *et al.*, 1999).

La mayoría de las investigaciones realizadas en el país sobre neumonías en rumiantes han sido en ovinos. En todos los estudios se informan datos imprecisos sobre incidencias del 19.7 al 39.9% (Pijoan y Chávez, 2003) y prevalencias hasta del 24% de neumonías clínicas



en becerros lactantes (Trigo, 1991), y del 10 – 40% en corderos; y mortalidades en corderos asociadas a neumonías que rebasan el 20%, afectando principalmente a los animales entre 2 y 3 meses de edad (Trigo, 1995; Pijoan *et al.*, 1999; González, 2002).

Estos resultados son el producto de estudios realizados en muestras intencionadas sin la determinación de un tamaño de muestra aleatoria, obtenidas en su mayoría de centros de diagnóstico en salud animal y de rastros, y en menor proporción de unidades pecuarias, por lo que no son lo suficientemente representativos, ni en cantidad ni en calidad, de una población de referencia expuesta al riesgo de pasteurelisis neumónica ya que los datos obtenidos de laboratorios de diagnóstico o de decomisos en rastros no son adecuados para hacer inferencias sobre tasas de prevalencia o incidencia de la enfermedad (Martin *et al.*, 1997).

El objetivo de esta investigación fue determinar las características y las diferencias fenotípicas y genotípicas, de los aislamientos de *Mannheimia spp.*, para contribuir a la descripción de la epidemiología molecular y dar claridad sobre las verdaderas prevalencias del complejo respiratorio bovino (mannheimiosis), con base en el estudio de muestras representativas de poblaciones animales de referencia, que permitieran hacer inferencias confiables sobre el riesgo de dicha enfermedad, en dos zonas ganaderas de gran importancia en México y con características productivas y climáticas muy particulares.

En este orden de ideas, en la primera etapa de esta investigación, se logró determinar la prevalencia de los diferentes serotipos de *Mannheimia spp.* en bovinos clínicamente sanos y enfermos de neumonía, así como los factores de riesgo asociados a dicha prevalencia en una muestra representativa de las unidades pecuarias y los bovinos de dos cuencas lecheras, así como de México.

Para ello, se llevó a cabo un muestreo aleatorio en dos complejos lecheros, uno ubicado en Tizayuca, Hgo. (CAIT) y el otro en la región de La Laguna (CLALA), Torreón, Coah., y Gómez Palacio, Dgo

Para el diseño del muestreo se aplicó la metodología propuesta por Segura y Honhold (2000), mediante un muestreo biaetápico por conglomerados. En la primera etapa se realizó un muestreo piloto para obtener una prevalencia estimada, con cuyo valor fue posible calcular los parámetros necesarios para estimar el tamaño mínimo de muestra en cada uno de los complejos lecheros.

Una vez obtenido el tamaño mínimo de muestra, en la segunda etapa, en las unidades pecuarias (UP) seleccionadas de los complejos lecheros (CAIT, n = 37; CLALA, n = 44), se obtuvieron muestras aleatorias de exudado nasal de los bovinos clínicamente sanos de neumonía (CSN) (CAIT, n = 680; CLALA, n = 1902) y de todos los clínicamente enfermos de neumonía (CEN) (CAIT, n = 194; CLALA, n = 189).

De igual manera, se logró la caracterización fenotípica de aislamientos del mismo microorganismo, obtenidos en pulmones neumónicos de bovinos sacrificados en los Rastros Municipales de Tlalnepantla (RMTL), Edo. de México y de Gómez Palacio (RMGP), Dgo. En dichos rastros se tomaron muestras no aleatorias de pulmones neumónicos (PN) (RMTL, n = 362; RMGP, n = 113).

El aislamiento y la fenotipificación de las cepas se realizó mediante los métodos convencionales de cultivo *in vitro*, tinción y pruebas bioquímicas que incluyeron además el microsistema API 20E, la serotipificación se realizó mediante la técnica de hemoaglutinación indirecta (HAI) descrita por Biberstein (1978).

El análisis estadístico fue realizado con el programa Epi Info<sup>®</sup>, Versión 3.3.2 para Windows (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, USA, 2004).

Con los datos obtenidos en los aislamientos de exudado nasal en el CAIT y la CLALA, se

calcularon las tasas de prevalencia aparente (TPA) y se estimaron las tasas de prevalencia verdadera (TPV), además se utilizaron las pruebas de Chi cuadrada o Fisher, según características de los datos, para evaluar la asociación, y el cálculo de la razón de momios (RM) para evaluar el grado de asociación de las variables en estudio. Para evaluar el efecto de las variables en su conjunto, se realizó un análisis de regresión logística, en el cual la variable dependiente fue el aislamiento o no de *Mannheimia spp.* Se seleccionaron sólo aquellas variables que por análisis univariado mediante Chi cuadrada tuvieron una probabilidad de error  $\leq 0.1$ , y para permanecer en el modelo una  $P \leq 0.05$ .

Con los datos obtenidos en los aislamientos de pulmones neumónicos en el RMTL y el RMGP, se calcularon las frecuencias de aislamiento de los diferentes serotipos en cada uno de los rastros estudiados. Se utilizaron las pruebas de Chi cuadrada o Fisher, según características de los datos, para evaluar las diferencias entre las frecuencias de aislamientos en los dos rastros.

Los resultados sobre la prevalencia y la caracterización fenotípica de los aislamientos obtenidos de exudado nasal de bovinos CSN y CEN, tanto en el CAIT como en la CLALA, dieron origen a dos **artículos científicos**, los cuales se presentan en los Capítulos III y IV de esta tesis.

Por su parte, los resultados sobre la frecuencia y la caracterización fenotípica de aislamientos del mismo microorganismo obtenidos en pulmones neumónicos de bovinos sacrificados en los Rastros Municipales de Tlalnepantla (RMTL), Edo. de México y de Gómez Palacio (RMGP), Dgo., dieron origen a un **artículo científico** que se presenta en el Capítulo V. Es menester aclarar que este apartado también incluye aislamientos de *P. multocida* que se obtuvieron de manera paralela durante el desarrollo del estudio.

No obstante que se disponen de diferentes métodos que permiten distinguir los distintos serotipos de Mh, es poco lo que se sabe respecto a las diferencias entre las cepas dentro de

un mismo serotipo. Diversos estudios han demostrado la gran variabilidad que existe entre cepas fenotípicamente parecidas a Mh, que probablemente compartan factores de virulencia (como la Lkt) y que sólo con la utilización de técnicas de genotipificación se podrían identificar diferencias no evidentes a través de la clasificación fenotípica y la serotipificación (Mutters *et al.*, 1985; De Ley *et al.*, 1990).

La clasificación de los aislados de los géneros *Pasteurella* y *Mannheimia* a través de técnicas de laboratorio rutinarias, basadas en criterios descriptivos convencionales, presentan un alto grado de dificultad, debido a la variabilidad y complejidad de las características fenotípicas y genotípicas de estos géneros. Adicionalmente, hay que tener en cuenta la capacidad de las bacterias para modificar de manera impredecible la expresión de algunas de sus características, pudiendo encontrarse variaciones fenotípicas aún en aislados de una misma cepa, e incluso cepas fenotípicamente nulas que no son tipificables, todo lo cual limita la efectividad de algunas técnicas clásicas para la identificación de bacterias que se basan en las diferencias fenotípicas. (Maslow and Mulligan, 1993; Versalovic and Lupski, 2002). Estos problemas de tipificación implican por lo tanto, dificultades en la reproducibilidad y el poder discriminatorio de muchas de las técnicas de fenotipificación, razón por la cual se han desarrollado numerosos sistemas basados en métodos de extracción y uso del ADN.

Entre los métodos de tipificación genómica, el estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, de los genes que codifican para el ARNr del ADN cromosómico, o ribotipificación, es una herramienta que ha demostrado ser de gran utilidad en estudios de epidemiología molecular de diferentes especies bacterianas (Grimont and Grimont, 1986; Blumberg *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 2006) y en estudios que involucran a *Pasteurella* (Murphy *et al.*, 1993; Chaslus-Dancla *et al.*, 1996; Angen *et al.*, 2002).

En México no se han realizado estudios para la caracterización genómica de cepas de *Mannheimia* obtenidas de bovinos.

En una segunda etapa de esta investigación, se utilizó la ribotipificación con el propósito de determinar las características y las diferencias genotípicas de 122 aislamientos de *M. haemolytica* (n= 116) y *M. glucosida* (n= 6) obtenidos de exudado nasal de bovinos CSN y bovinos CEN, para contribuir a la descripción de la epidemiología molecular del complejo respiratorio bovino (mannheimiosis) en dos zonas ganaderas de gran importancia en el país. La ribotipificación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por diversos autores (Snipes *et al.*, 1989; Snipes *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1993; Chaslus-Dancla *et al.*, 1996; Kodjo *et al.*, 1999; DeRosa *et al.*, 2000; Blackall *et al.*, 2001; Brown, 2001; Magliano *et al.*, 2001; Angen *et al.*, 2002). Para ello, se realizó la extracción del ADN cromosómico de los aislamientos mediante un protocolo con tiocianato de guanidina, según el método descrito por Pitcher *et al.*, (1989), y después se realizó la digestión del ADN con la enzima de restricción *HindIII* (Invitrogen®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante; los productos de las digestiones se separaron por electroforesis en geles de agarosa y fueron transferidos a membranas de nylon mediante el método de transferencia capilar (Southern blot).

Posteriormente, la sonda que contiene el operón *rrnB* ARNr de *E. coli* se obtuvo del plásmido pKK3535 (Brosius *et al.*, 1981), mediante la extracción del ADN plasmídico pKK3535 utilizando el sistema comercial QIAprep (QIAGEN®), el ADN obtenido se digirió con la enzima de restricción *BclI* (New England BioLabs®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda de 5.9 kb que contiene el operón *rrnB* fue purificada utilizando el sistema comercial QIAEX II (QIAGEN®) y posteriormente fue marcada con digoxigenina utilizando el sistema DIG- High Prime (Roche®).

Finalmente, se llevó a cabo la hibridación de las membranas de nylon que contenían los productos de la digestión del ADN cromosómico de los aislamientos, con una solución que contenía la sonda marcada. Para la detección de las bandas, las membranas se cubrieron con reactivo iniciador (CA Starter- CSPD [Roche®]) y se expusieron a películas autoradiográficas (Hyperfilm Amersham Biosciences).

Los patrones de los ribotipos obtenidos fueron analizados mediante el Diversity Database Software, version 2.0 (Bio-Rad, California, USA). Se elaboraron dendrogramas para analizar la similitud entre los aislamientos y la cepa de referencia de *M. haemolytica* mediante el coeficiente de Dice con máxima similitud. El análisis de los cluster se realizó mediante el uso del Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Averages (UPGMA).

Los resultados sobre la caracterización genotípica de los aislamientos obtenidos de exudado nasal de bovinos CSN y CEN, tanto en el CAIT como en la CLALA, dieron origen a un **artículo científico**, el cual se presenta en el Capítulo VI.

Adicionalmente, se llevó a cabo la ribotipificación de aislamientos de Mh y Mg obtenidos de pulmones neumónicos, así como de aislamientos no tipificables de *Mannheimia* spp. obtenidos en exudado nasal y en pulmones neumónicos. Estos resultados no hacen parte de la presente entrega pero se informan en el Capítulo VIII como parte de las perspectivas de esta investigación.

## **CAPÍTULO II**

### **Epidemiología del complejo respiratorio bovino**

**(Revisión de literatura)**

## **Epidemiología del complejo respiratorio bovino**

### **1. Antecedentes**

Entre las enfermedades infecciosas que afectan al ganado bovino, las de origen respiratorio son la principal causa de pérdidas en el ámbito mundial, especialmente en animales jóvenes (Lekeu, 1996). El complejo respiratorio bovino es una de las enfermedades más costosas que afectan al ganado bovino de leche o de carne, especialmente en aquellos animales de reciente ingreso en el hato; las neumonías son responsables de aproximadamente el 75% de los casos clínicos, y están incriminadas directamente en, aproximadamente, el 45 al 55% de la mortalidad, y el tratamiento médico de las mismas llega a representar el 8% de total de los costos de producción (Zecchinon *et al.*, 2005).

Los microorganismos del género *Pasteurella* constituyen las bacterias más frecuentemente aisladas de los procesos neumónicos de los animales domésticos; entre los cuales el problema de mayor significación es el complejo respiratorio bovino, también llamado fiebre de embarque; enfermedad respiratoria generalmente fatal que se caracteriza por una pleuroneumonía fibrinosa grave, y que afecta principalmente animales menores de un año recientemente transportados, o a becerros de 1 a 5 meses de edad, con una mayor incidencia en animales nacidos durante otoño e invierno (Trigo, 1987; Murphy *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 1997; Pijoan *et al.*, 1999; Lo RYC, 2001). Se calcula que aproximadamente el 25% de los becerros experimentan al menos un episodio de enfermedad respiratoria durante el primer año de vida, con tasas que van del 14 al 38%; estas incidencias son mayores en los becerros machos que en las hembras, tanto en la etapa de lactancia como en los periodos de engorda (Zecchinon *et al.*, 2005).

La pasteurelosis pulmonar bovina se considera la enfermedad económicamente más importante en bovinos de carne y la segunda, después de las enfermedades gastrointestinales, en becerras lecheras (Katsuda, 2007) y una de las principales causas de



pérdidas en la industria ganadera bovina del mundo; se calcula que representa el 30% de la mortalidad total en bovinos y al menos el 1% en las ganaderías de engorda, y está relacionada con pérdidas económicas por más de 1 billón de dólares tan sólo en Norte América (Trigo, 1987; Burrows *et al.*, 1993; Highlander, 2001; Lo RYC, 2001; Narayanan *et al.*, 2002). Además, es responsable de la morbilidad y pérdidas por ganancia de peso en al menos un 10% adicional de estas ganaderías; consecuentemente, los costos por la enfermedad en la industria ganadera de los Estados Unidos de Norteamérica son de, al menos, 640 millones de dólares anuales (Highlander, 2001). Por su parte, Pijoan *et al.*, (1999), resalta a esta enfermedad como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en becerras lecheras en Estados Unidos y Canadá, con brotes que llegan a afectar al 80 o 90% de los animales y con tasas de letalidad menores al 5%.

En México hay muy pocos estudios que hayan evaluado el impacto económico de las enfermedades neumónicas en la industria bovina (Trigo, 1987). Pijoan y Chávez (2003), concluyeron que los costos directos variaron entre 83.25 y 501.41 pesos, y los costos indirectos entre 235.12 y 301.07 pesos, por becerro nacido en establos de Tijuana, Baja California.

La etiología de la pasteurelisis pulmonar bovina es multifactorial y se ven involucrados diversos factores de riesgo que determinan la presentación y severidad de las lesiones neumónicas, dentro de este cortejo de factores destacan aquellos relacionados con el manejo y que generan estrés tales como: cambios bruscos de temperatura, hacinamiento, transporte, confinamiento de animales de diferentes edades, condiciones del destete, nivel de inmunoglobulinas en el calostro, entre otros; así como la participación de otros agentes infecciosos de origen bacteriano y particularmente agentes primarios de tipo viral, tales como, virus sincitial, parainfluenza 3, rinotraqueitis infecciosa bovina (herpes virus 1) y ocasionalmente adenovirus (Trigo, 1991; Murphy *et al.*, 1993; Pijoan *et al.*, 1999;

Narayanan *et al.*, 2002) . Estos virus causan efecto citopático directo en el aparato respiratorio, y además, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar, lo cual facilita la colonización pulmonar por *Pasteurella* spp. (Trigo, 1991).

Las especies del género *Pasteurella* son comensales habituales del tracto respiratorio superior de los rumiantes domésticos y silvestres, y no obstante que Mh y *P. multocida* con mucha frecuencia se encuentran asociadas con enfermedades respiratorias, hay variaciones entre las diferentes cepas en su capacidad para producir enfermedad en los diferentes hospedadores animales (Jaworski *et al.*, 1998; Highlander, 2001).

*P. multocida* se ha identificado como un importante patógeno de los animales durante muchos años, sin embargo, la frecuencia y la significancia de Mh como un patógeno potencial ha sido reconocida ampliamente en los últimos años, y numerosas investigaciones sobre enfermedades virales ha demostrado que el papel de *P. multocida* y Mh, es más frecuentemente como invasores secundarios que como causa primaria de enfermedad (Carter, 1967).

Mh es la bacteria más patógena y más comúnmente asociada al complejo de las enfermedades respiratorias de los bovinos, particularmente a la pasteurelosis neumónica bovina (Burrows *et al.*, 1993; Fedorova and Highlander, 1997; Lo RYC, 2001, Narayanan, *et al.*, 2002). La bacteria es un habitante normal de las criptas de las tonsilas del bovino sano y, además, un importante oportunista del tracto respiratorio debido a que usualmente coloniza la parte alta del mismo, y bajo ciertas condiciones de inmunosupresión del hospedador afecta sus mecanismos de defensa, lo cual permite que la bacteria se establezca y se multiplique rápidamente, y penetre a los pulmones durante la inhalación e inicie una infección activa del epitelio alveolar (Narayanan *et al.*, 2002).

Esta bacteria ha sido sometida a una extensa reclasificación; originalmente fue llamada *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt en 1885 (Highlander, 2001, Zecchinon *et al.*, 2005); posteriormente, en 1896, Flugge la renombra *Bacillus bovisepitica* (Highlander, 2001) y en 1932, Newson y Cross proponen el nombre de *Pasteurella haemolytica* (Angen *et al.*, 1999a; Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005). Posteriormente, entre 1959 y 1961, Smith describe dos biotipos de *P. haemolytica* sobre la base de características fenotípicas y de diferencias epidemiológicas y patológicas, clasificándolos como A y T, según su habilidad de fermentar la L-arabinosa o la trealosa, respectivamente (Biberstein, 1978; Fraser *et al.*, 1982; Angen *et al.*, 1999a; Highlander, 2001; Boyce *et al.*, 2004; Zecchinon *et al.*, 2005).

Biberstein y colaboradores, desarrollaron en 1960 un sistema de serotipificación basado en la hemoaglutinación indirecta (HAI) de antígenos capsulares solubles (Biberstein, 1978; Angen *et al.*, 1999a) y en 1962, Biberstein y Gills informaron sobre una asociación consistente entre los serotipos y los biotipos y se establece una serotipificación capsular (Biberstein, 1978; Angen *et al.*, 1999a; Lo RYC, 2001; Highlander, 2001; Boyce *et al.*, 2004). En investigaciones subsecuentes el número de serotipos reconocidos aumentó a 17 (Angen *et al.*, 1999a; Fodor and Varga, 1988); los serotipos 3, 4, 10 y 15 asociados con el biotipo T y el resto con el biotipo A; las cepas no tipificables por HAI fueron clasificadas posteriormente por contra-inmunolectroforesis, demostrándose nueve serogrupos adicionales (Angen *et al.*, 1999a; Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005).

En 1990, a partir de los resultados obtenidos en estudios sobre hibridación ADN-ADN, propiedades bioquímicas y análisis genéticos, los serotipos T3, T4, T10 y T15, del biotipo T, fueron reclasificados como una especie separada que se denominó *Pasteurella trehalosi* (Highlander, 2001; Lo RYC, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005). En 1995, Younan y Fodor reportaron el aislamiento de *P. haemolytica* serotipo 17 (A17). (Younan and Fodor, 1995;

Boyce *et al.*, 2004). Recientemente, *P. trehalosi* ha sido reclasificada como *Bibersteinia trehalosi* (Blackall *et al.*, 2007)

## **2. *Mannheimia haemolytica***

El género *Pasteurella* está conformado por un amplio grupo de especies de bacterias que se entrecruzan en sus características fenotípicas y genotípicas, por lo que desde hace varios años se han realizado investigaciones con el propósito de clasificarlas adecuadamente. Los primeros estudios sobre hibridación del ADN-ARN demostraron una homología del 8-24% entre aislamientos de *P. haemolytica* y *P. trehalosi*; posteriores investigaciones validaron dichos resultados con estudios de hibridación de ADN-ADN, los cuales mostraron una homología del 0-35% entre *P. haemolytica* y *P. trehalosi* (Jaworski *et al.*, 1998).

En 1999, mediante estudios de ribotipificación, electroforesis de enzimas multi-locus, secuenciación del gene 16S del RNAr e hibridación ADN-ADN, los serotipos de *P. haemolytica* A fueron reclasificados en el nuevo género *Mannheimia*. En consecuencia, los anteriores serotipos A de *P. haemolytica* (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16 y 17) fueron renombrados como Mh. El serotipo 11 restante, el cual no está relacionado con Mh se renombró como Mg (Angen *et al.*, 1999a; Lo RYC, 2001; Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005).

Según la clasificación propuesta por Angen *et al* (1999a), el género *Mannheimia* comprende cinco especies: *M. haemolytica*, (originalmente *P. haemolytica* biogrupo 1) que incluye los serotipos 1, 2, 5-9, 12-14 y 16, todos aislados solamente de rumiantes. *M. granulomatis*, que incluye a cepas previamente clasificadas como *P. granulomatis*, Bisgaard taxón 20 y *P. haemolytica* biogrupo 3J. Incluye también todas las cepas clasificadas genéticamente como *P. haemolytica*-like aisladas de conejos, liebres así como de bovinos, y asociadas con neumonías y conjuntivitis purulenta en lepóridos, y con granulomas en piel y otras enfermedades en bovinos. *M. glucosida*, incluye cepas

originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos 3 A-H y 9, así como al serotipo 11 y todas sus cepas, la mayoría aisladas de cavidad nasal de borregos, en algunos casos con neumonías u otras enfermedades. *M. ruminalis*, que incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii* y *P. haemolytica* biogrupo 3J, aisladas del rumen de bovinos y ovinos no asociadas a estados patológicos. Por último, *M. varigena*, que comprende un grupo de cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupo 6 y Bisgaard taxón 15 y 36; han sido aisladas de bovinos y porcinos, y asociadas con sepsis, neumonía y otros estados patológicos (Angen *et al.*, 1999a; Angen *et al.*, 1999b; Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005).

Mh es una bacteria Gram-negativa, encapsulada, no móvil, de forma cocobacilar o de bacilo pequeño pleomórfico, (1 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro), mesofílica, aerobia y anaerobia facultativa, oxidasa positiva e indol negativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas. Es negativa a las pruebas de rojo de metilo, gelatinasa, Voges-Proskauer. Crece en agar MacConkey, en medios enriquecidos como agar chocolate o agar sangre formando colonias lisas de color blanco grisáceo, con tamaños de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 h de incubación. La mayoría de las cepas producen una  $\beta$ -hemólisis cuando crecen en agar con sangre de bovino. Es capaz de fermentar D-sorbitol, D-xilosa, maltosa y dextrina; no fermentan arabinosa o glucósidos, y son negativas a la ornitina descarboxilasa y NPG ( $\beta$ -glucosidasa) pero positivas a ONPF ( $\alpha$ -fucosidasa). La presencia de cápsula con propiedades de superficie antifagocíticas, la hacen parcialmente resistente a fagocitosis (Angen *et al.*, 1999a; Boyce *et al.*, 2004).

Mh se aísla normalmente de procesos neumónicos en bovinos y ovinos, y también de procesos septicémicos en borregos y de mastitis en ovejas. Algunos de los serotipos probablemente forman parte de la microflora residente del tracto respiratorio superior de los

rumiantes, aunque con frecuencia es difícil su aislamiento (Murphy *et al.*, 1993; Angen *et al.*, 1999a; Boyce *et al.*, 2004). En bovinos que desarrollan pasteurelisis neumónica, probablemente sean portadores sanos de la cepa de Mh que causa la neumonía, o es posible que sean cepas adquiridas de otros animales (Murphy *et al.*, 1993).

Es el principal agente etiológico en el complejo de las enfermedades respiratorias de los bovinos, particularmente de la pasteurelisis pulmonar bovina (Trigo, 1991; Pijoan *et al.*, 1999; Angen *et al.*, 1999b). Constituye un nuevo miembro de la familia *Pasteurellaceae* que originalmente incluía los géneros *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella* (HAP). La mayoría de los miembros de la familia HAP son comensales de la mucosa de mamíferos, incluyendo humanos, pájaros y reptiles, no obstante, muchos son patógenos oportunistas y pueden producir enfermedad bajo condiciones apropiadas (Lo RYC, 2001; Boyce *et al.*, 2004).

De los 12 serotipos reconocidos de Mh, S1 y S2 son los más prevalentes en el mundo. Estos dos serotipos son los que con mayor frecuencia se aíslan de becerros (Wray and Thompson, 1971); el S1 es el que con mayor frecuencia se aísla de las lesiones neumónicas en los casos de fiebre de embarque (mannheimiosis bovina), aún cuando en ocasiones también se aíslan los serotipos 2, 5, 6, 7 y 9 (Colin *et al.*, 1987; Burrows *et al.*, 1993; Pandher *et al.*, 1999; Pijoan *et al.*, 1999; Highlander, 2001; Lo RYC, 2001; Narayanan *et al.*, 2002; Zecchinon *et al.*, 2005). Los serotipos 11 (Mg) y 12 también han sido reportados (Zecchinon *et al.*, 2005; Jaramillo-Arango *et al.*, 2007; Jaramillo-Arango *et al.*, 2008). No obstante que en los bovinos, por lo general, sólo se encuentran los serotipos 1 y 2, este último se asocia con la pasteurelisis neumónica más frecuentemente en ovinos que en bovinos (Colin *et al.*, 1987; Burrows, 1993; Blanco-Viera *et al.*, 1995). Estos dos serotipos son capaces de colonizar el tracto respiratorio superior de bovinos y ovinos y con frecuencia son especie-específicos en su capacidad de afectar el tracto respiratorio inferior

produciendo enfermedad (Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005). En los bovinos sanos es común que el serotipo 2 esté presente en el tracto respiratorio superior, pero después de un estado de estrés o de una infección viral, el serotipo 1 rápidamente reemplaza al 2 como el serotipo principal; esto probablemente se deba a una transmisión horizontal a partir de animales enfermos que tengan el serotipo 1 activo en secreciones nasales (Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005). Se ha podido comprobar que el S2 predominaba en exudado de becerros en granja, y cuando estos animales fueron trasladados a corrales de subasta y luego a corrales de engorda se encontró que predominaba el S1. En los ovinos es posible aislar cualquiera de los serotipos (Biberstein, 1978; Colin *et al.*, 1987).

### **3. Mecanismos de patogenicidad**

Los mecanismos de patogenicidad de algunos de los miembros de la familia *Pasteurellaceae* no están aún muy claramente definidos, particularmente la patogénesis de la pasteurelosis neumónica bovina, ya que algunos de los mecanismos que le permiten a Mh establecerse y diseminarse durante la infección, no están esclarecidos satisfactoriamente, incluso existe la posibilidad de que haya diferencias en dichos mecanismos entre las cepas aisladas de diversos cuadros neumónicos, así como de cepas procedentes de animales sanos (Highlander and Fedorova, 2000; Highlander 2001; Lo RYC 2001).

En las cepas de Mh que afectan a los rumiantes se han identificado diversos mecanismos de expresión de su patogenicidad a través de potentes antígenos, los cuales incluyen: una leucotoxina (Lkt) con actividad específica contra leucocitos; lipopolisacáridos (LPS); proteínas de membrana externa (PME); proteínas reguladas por hierro (PRH); fimbrias; enzimas (neuraminidasa, proteasas, metaloglicoproteasas), antígenos aglutinantes serotipo-específico y adhesinas; además de la cápsula y plásmidos de resistencia a antibióticos (Burrows *et al.*, 1993; Fedorova and Highlander 1997; Lo RYC *et al.*, 2001; Marciel and

Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2002). Todos estos mecanismos juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad, sin embargo, sólo la Lkt es extracelular y es considerado el factor de patogenicidad primario más importante (Fedorova and Highlander, 1997; Highlander *et al.*, 2000; Marciel and Highlander, 2001; Narayanan *et al.*, 2002). En los siguientes párrafos se mencionarán algunos de los mecanismos de patogenicidad que se consideran más importantes.

### **3.1. Leucotoxinas (Lkt)**

Las Lkt son un grupo de exotoxinas que producen su efecto tóxico primario en contra de los leucocitos, en particular los leucocitos de rumiantes, especialmente las células polimorfo nucleares (PMN) (Deshpande *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2002; Narayanan *et al.*, 2002; Sleim, 2005). La toxina origina una amplia variedad de efectos biológicos sobre los leucocitos bovinos, cuyo resultado final es una pleuroneumonía fibrinosa aguda (Deshpande *et al.*, 2002; Narayanan *et al.*, 2002).

En estudios realizados por Markham y Wilkie en 1980, citados por Boyce *et al.*, (2004) observaron que el sobrenadante libre de células de cultivos de Mh S1 podían producir fagocitosis a bajas concentraciones y eran citotóxicas a altas concentraciones; posteriormente se pudo descubrir que el sobrenadante contenía una leukotoxina (Lkt) termolábil secretada por Mh durante su crecimiento exponencial (Highlander, 2001; Boyce *et al.*, 2004).

La Lkt A de Mh forma parte de la familia de exotoxinas producidas por bacterias Gram-negativas, llamadas toxinas RTX, en razón de que contienen un número variable de dominios de aminoácidos repetidos ricos en glicina de los cuales la familia de toxinas RTX ("repeats-in-toxin") deriva su nombre y que causan una amplia variedad de efectos característicos sobre las células en que actúan. (Hsuan *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Highlander *et al.*, 2000; Highlander 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Narayanan *et al.*, 2002;



Boyce *et al.*, 2004; Zecchinon *et al.*, 2005). Las toxinas RTX se han encontrado en los 17 serotipos del género *Mannheimia* (Boyce, *et al.*, 2004).

Los genes de la leucotoxina de Mh han sido secuenciados y la toxina se ha expresado en *E. coli*. La organización genética del operón de la Lkt de Mh (*lktCABD*) es similar a la del operón de la hemolisina de *E. coli* (*hlyCABD*), y contiene cuatro genes. El primer gen es el *lktC* el cual codifica una proteína (LktC) que es la responsable de la activación de la leucotoxina (Lkt) por acilación. El segundo gen es el *lktA* el cual codifica la estructura proteínica de la leucotoxina (LktA). Finalmente, los genes *lktB* y *lktD* codifican para las proteínas LktB y LktD, que en conjunto son responsables de la transportación y la secreción de la leucotoxina (LktA) (Fedorova and Highlander, 1997; Hsuan *et al.*, 1998; Highlander *et al.*, 2000; Narayanan *et al.*, 2002) La Lkt de Mh tiene una estrecha especificidad contra células blanco y es citotóxica contra los leucocitos de rumiantes (Boyce *et al.*, 2004), y se ha identificado a la molécula CD18 como el receptor que interviene en la adherencia de la Lkt con los leucocitos de rumiantes (Hsuan *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Narayanan *et al.*, 2002; Boyce *et al.*, 2004).

La actividad de la LktA contra las células blanco es dosis-dependiente y se puede clasificar en tres categorías. A muy bajas concentraciones la leucotoxina activa las células blanco para experimentar una interrupción de la respiración y la degranulación. A medida que la concentración de leucotoxina se incrementa las células blanco son estimuladas para que experimenten apoptosis (muerte celular programada); cuando la concentración de la leucotoxina es alta se presenta una necrosis de las células blanco como consecuencia del daño a la membrana debido a la formación de poros. De esta manera se aumenta la posibilidad de colonización de la mucosa respiratoria por parte de la bacteria (Highlander, 2001; Narayanan *et al.*, 2002).

El efecto más y mejor conocido de las toxinas RTX sobre los neutrófilos es la formación de poros (0.9 a 3 nm de diámetro) que atraviesan la membrana (Boyce *et al.*, 2004). En altas concentraciones la Lkt causa una rápida (5-15 min.) pérdida del potasio intracelular y el hinchamiento de la célula. La formación, dependiente del calcio, de numerosos defectos de la membrana plasmática, incluyen poros hasta de 10 nm de diámetro sobre la superficie de la célula; estos poros hacen que la membrana celular sea permeable a los iones y a la salida de agua lo que origina la lisis celular (Highlander *et al.*, 2000; Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Narayanan *et al.*, 2002; Boyce *et al.*, 2004).

Por tanto, en la pasteurelisis pulmonar, los macrófagos alveolares desempeñan un papel central en todos los procesos celulares y la cascada inflamatoria que conduce al daño pulmonar (Narayanan *et al.*, 2002). Entre los leucocitos, los macrófagos son más resistentes que los neutrófilos contra el efecto lítico de las Lkt, y entre los macrófagos alveolares, son más resistentes los de los bovinos adultos que los de becerros menores a 16 semanas de edad (Zecchinon *et al.*, 2005)

La inducción de la secreción y la liberación de péptidos quimiotácticos vasoactivos por células maestras, aumenta el número de leucocitos disponibles en el lugar de la inflamación con lo cual se produce depósitos fibrinosos en el lugar de la inflamación, lo cual culmina en una neumonía fibrino purulenta aguda. Cualquier oportunidad de respuesta inmune secundaria es interrumpida por la actividad de la Lkt previniendo la blastogénesis de los linfocitos (Narayanan *et al.*, 2002).

La interacción de la Lkt con el sistema inmune del hospedador es compleja e inteligente. Induce efectos biológicos en los leucocitos bovinos de una manera especie-específica (Jeyaseelan *et al.*, 2001), pone al sistema del hospedador a trabajar en beneficio de la bacteria y deja a los tejidos de dicho hospedador desvalido en contra de la infección (Narayanan *et al.*, 2002).

### **3.2. Proteínas de membrana externa (PME)**

Se han realizado estudios enfocados a la identificación de proteínas de la superficie celular y PME producidas por diversos serotipos de *P. haemolytica* como potenciales inmunógenos para prevenir la pasteurelosis neumónica en el ganado (Squire *et al.*, 1984; Pandher *et al.*, 1999).

Los resultados de diversos estudios resaltan que las PME de Mh constituyen algunos de los más importantes antígenos para la estimulación de respuesta inmune en contra de la pasteurelosis neumónica (Pandher and Murphy, 1996; Pandher *et al.*, 1999) y se ha podido comprobar una correlación estadísticamente significativa entre la resistencia a la enfermedad y la presencia de anticuerpos séricos dirigidos contra una gran cantidad de proteínas presentes en extractos salinos de la célula bacteriana íntegra (Purdy *et al.*, 1993; Confer and Panciera, 1994; Morton *et al.*, 1995; Pandher and Murphy, 1996).

Se sabe entonces, que las PME tienen un gran potencial para desarrollar inmunógenos, especialmente aquellas expuestas en la superficie (Gulig *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 1985; Morton *et al.*, 1995; Highlander, 2001). Las proteínas expuestas en la cápsula de la célula bacteriana son un objetivo de gran interés para la respuesta inmune del hospedador. Dos mecanismos muy importantes en la inmunidad de los bovinos en contra de *P. haemolytica*, la muerte mediada por el complemento y la fagocitosis mediada por los neutrófilos, son mejorados por la opsonización de la bacteria y por la eliminación de la cápsula (Pandher and Murphy, 1996).

Se considera que los anticuerpos para las PME de las bacterias gram-negativas también suministran protección contra la infección por *P. haemolytica*. Es probable que estos anticuerpos promuevan la fagocitosis y quizá también la muerte por menoscabo de la función de estas proteínas (Squire *et al.*, 1984).

Si bien el papel de las PME como factor de virulencia no está del todo dilucidado, diversos estudios han confirmado su importancia en la patogénesis de las infecciones y resaltan su participación potencial en la respuesta de anticuerpos en la protección antibacteriana, además de que participan como transportadoras de materiales a través de la membrana (porinas) y en la adhesión a la célula hospedera (Squire *et al.*, 1984; Iovane *et al.*, 1998).

De igual manera, se ha podido comprobar que las PME aisladas de *P. haemolytica* son poderosas moduladoras de la actividad de los leucocitos polimorfonucleados de bovinos e inducen alteraciones en su actividad biológica, de tal manera que es posible observar *in vitro*, una reducción dosis dependiente en la capacidad de adherencia a la pared de nylon. Se cree que es posible que pequeñas cantidades de PME estimulen la quimiotaxis y la adherencia de los neutrófilos, favoreciendo de esta manera su acumulación en el foco inflamatorio inicial (Iovane, 1998).

En ratones inmunizados con PME de *P. haemolytica* S1 y desafiados con *P. haemolytica* S1 viva o con PME, se desarrolló neumonía broncointersticial muy similar a la pasteurelosis neumónica bovina, además se presentó una alta concentración de títulos de anticuerpos contra las PME, lo cual sugiere que el complejo inmune juega un papel muy importante en la patogénesis de la pasteurelosis neumónica bovina (McBride *et al.*, 1999).

El meta-análisis de 27 estudios realizados a lo largo de 12 años con vacunas experimentales y comerciales, reveló que aquellas que aportaron PME y otros antígenos de superficie suministraron los mejores niveles de protección contra desafíos con *P. haemolytica*, equivalente al proporcionado por vacunas vivas (Srinand *et al.*, 1995).

La capacidad inmunogénica varía entre los diferentes serotipos de Mh, esto se ha podido comprobar con desafíos intratraqueales de ovejas con Mh S2, S7 y S9 inmunizadas con extractos de PME de los mismos serotipos, aunque se encontraron altos niveles de

anticuerpos sólo la vacuna con PME de S7 produjo protección efectiva contra infección homóloga y heteróloga por Mh S2, S7 y S9 (Sabri *et al.*, 2000).

Se ha comprobado que la presencia de anticuerpos contra PME de *P. haemolytica* tienen una correlación estadística con la resistencia a desafíos experimentales con dicho microorganismo en vacas. Se pudo clonar y secuenciar el gene que codifica una de dichas proteínas (PlpE) la cual es una lipoproteína similar a una lipoproteína de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Phander, *et al.*, 1998). Estudios posteriores han podido demostrar que esta proteína recombinante (rPlpE) es altamente inmunogénica cuando se inyecta por vía subcutánea en bovinos y la inmunidad adquirida aumenta considerablemente en desafíos experimentales (Confer *et al.*, 2003; Ayalew *et al.*, 2004).

### **3.3. Sialoglicoproteasa (Gcp)**

Entre los antígenos presentes en el sobrenadante de cultivos de *P. haemolytica* A1 destaca una O-sialoglicoproteína (Gcp) que es una metaloproteasa neutra, con actividad de endopeptidasa y neuroaminidasa, que tiene la capacidad de fraccionar glicoproteína A tipo mucina en diferentes sitios (Abdullah *et al.*, 1992; Shewen and Wilkie, 1988; Nakada *et al.*, 1993; Purdy *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Lee and Shewen, 1996; Nyarko *et al.*, 1998; Jaramillo *et al.*, 2000; Boyce *et al.*, 2004; Highlander, 2001).

La presencia de anticuerpos (IgG1 e IgG2) contra la Gcp se pudo comprobar mediante el uso de sobrenadante de un cultivo de *P. haemolytica* A1 en fase de crecimiento logarítmico, que contenía un enzima proteolítica específica para Gcp, con el cual se vacunaron y se desafiaron grupos de becerros en muchos de cuyos sueros se pudo comprobar que contenían IgG1 e IgG2, además, aquellos animales que tuvieron anticuerpos anti-Gcp presentaron una neumonía más leve a la necropsia; estos resultados demostraron que la Gcp es inmunogénica y que la bacteria produce la enzima “*in vivo*” (Lee *et al.*, 1994). El suero

de bovinos convalecientes presenta actividad de Gcp, lo cual sugiere que esta Gcp es inmunogénica en los animales (Boyce *et al.*, 2004).

Las células blanco de la Gcp aún no han sido bien definidas, pero probablemente son sialoglicoproteínas presentes en la superficie de las células de la superficie de la mucosa, macrófagos alveolares, neutrófilos alveolares u otros leucocitos (Boyce, *et al.*, 2004). No obstante que el papel de la Gcp en la patogénesis no ha sido bien demostrado, se ha sugerido que su actividad interfiere con la adhesión de los neutrófilos por una escisión de la *O*-sialoglycoproteína de las moléculas de adhesión celular; alternativamente, la Gcp puede interferir con la respuesta inmune del hospedero por una escisión de las moléculas de la IgG séricas o quizá contribuya en la colonización bacteriana (Conlon *et al.*, 1991, Boyce *et al.*, 2004). El gen de Gcp ya fue clonado en *E. coli* y secuenciado, desafortunadamente la Gcp se encontró agregada e inactiva en el periplasma de *E. coli* (Abdullah *et al.*, 1991). En becerros que habían sido desafiados con Mh A1 se logró inducir una protección significativa con la administración solamente de la Gcp como vacuna (Shewen *et al.*, 2003).

### **3.4. Neuraminidasa**

La neuraminidasa es producida por Mh “*in vivo*” ya que anticuerpos antineuraminidasa se pueden encontrar en el suero de bovinos después de una infección transtoraxica con bacterias (Straus and Purdy, 1994; Boyce *et al.*, 2004). No obstante que el papel de la neuraminidasa en la neumonía bovina es desconocido, esta enzima ha sido implicada como factor de virulencia en diversos patógenos de mucosas (Boyce *et al.*, 2004). La producción de neuraminidasa por especies de *Pasteurella* fue reportada por primera vez por Scharman en 1970, demostrando que 102 de 104 cepas de *P. multocida* y 3 de 5 cepas de *P. haemolytica* habían producido la enzima (Scharman W, citado por Straus *et al.*, 1993a y Straus and Purdy, 1994). Straus *et al.*, (1993a), pudieron demostrar que todos los serotipos de *P. haemolytica*, excepto el serotipo A11 son capaces de producir neuraminidasa.

Se ha demostrado que la actividad protectora de la secreción salivar se reduce cuando se remueven los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas salivares; es posible que la neuraminidasa ejerza un efecto patogénico mediante la remoción de los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas del hospedador, y de esta manera reduce el efecto protector del moco incrementando la adherencia de Mh al epitelio de la mucosa, particularmente en el tracto respiratorio superior (Confer *et al.*, 1986; Jaramillo *et al.*, 1999; Highlander, 2001; Boyce *et al.*, 2004). También se ha podido demostrar que asilamientos de *P. (Mannheimia) haemolytica* A1 pudieron producir niveles más altos de neuraminidasa que cepas del serotipo A2, lo cual puede evidenciar que la neuraminidasa está involucrada en la invasión de Mh en los procesos neumónicos (Frank and Tabatabai, 1981; Straus *et al.*, 1993b).

### **3.5. Lipopolisacáridos (LPS)**

El LPS de Mh es estructuralmente similar al de una bacteria típica Gram-negativa. Este LPS tiene las actividades propias de las endotoxinas de Gram-negativas: pirogénicas, activación de macrófagos, inducción del factor de tumoración, activación de la coagulación en cascada, agregación de plaquetas e inducción del shock hipotensivo (Paulsen *et al.*, 1989; Boyce *et al.*, 2004; Zecchinon *et al.*, 2005).

La administración intrabronquial de LPS purificado de Mh originó la exudación de fibrina y neutrófilos, edema pulmonar y agregación de plaquetas en los capilares, implicando al LPS como la principal causa de necrosis microvascular y trombosis (Paulsen *et al.*, 1989; Boyce *et al.*, 2004). El LPS de *P. haemolytica* A1 fue capaz de causar daño directo sobre las células del endotelio de las arterias pulmonares *in vitro*; demostrando la función potencial de las endotoxinas en la patogénesis de la lesión vascular en la pasteurellosis bovina (Paulsen *et al.*, 1989).

La participación del LPS podría ser el resultado de las funciones moduladas por los leucocitos bovinos y la simulación de la respuesta inflamatoria del hospedero, de este modo

se exagera el daño a los tejidos del hospedero; de igual manera, el LPS participa como mediador en el incremento de las citocinas proinflamatorias, lípidos mediadores, procoagulantes, radicales de oxígeno y proteasas generados por los monolitos y los macrófagos bovinos (Boyce *et al.*, 2004; Zecchinon *et al.*, 2005). Se ha podido demostrar que el LPS incrementa la actividad citolítica de la Lkt y que aumenta la expresión Lkt-dependiente de la IL8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Lafleur *et al.*, 1998). Es probable que en vivo el LPS y la Lkt actúen de manera sinérgica causando daño a los tejidos e inflamación (Highlander, 2001).

### **3.6 Adhesinas**

Se sabe de manera general que las bacterias se pueden adherir a las superficies epiteliales a través de receptores específicos, de tal manera que los factores bacterianos involucrados en la interacción bacteria-célula son muy diversos; entre algunas de las estructuras bacterianas que pudieran participar en la adherencia se reconocen las fimbrias, adhesinas no fimbriales, adhesinas proteináceas, el glicocalix, el LPS, proteínas de membrana externa y la capsula (Jaramillo *et al.*, 1999). Poco se sabe acerca de las moléculas que participan en la habilidad de Mh para colonizar la faringe las criptas tonsilares; es probable que codifique una adhesina que permita a la bacteria atacar el epitelio respiratorio (Highlander, 2001), también se ha insinuado la participación del LPS, las fimbrias y el glicocalix (Jaramillo *et al.*, 1999); se ha podido demostrar la capacidad del LPS de *P. haemolytica* para producir adherencia “*in vitro*” (Paulsen *et al.*, 1990), también se conoce que el componente del polisacárido capsular facilita que *P. haemolytica* puede unirse específicamente a los fagocitos e impedir el desarrollo de sus funciones (Jaramillo *et al.*, 1999). Se sabe que existen dos tipos de fimbrias en Mh, unas largas y rígidas de 12 nm, y otras cortas y flexibles de 5nm, las cuales pudieron ser evidenciadas especialmente cuando las bacterias



fueron recuperadas de lavados traqueales de becerros infectados experimental o naturalmente (Sleim, 2005).

El papel funcional de las adhesinas de *P. haemolytica* en la patogénesis debe ser estudiado más a detalle, no obstante es muy posible que esta adhesina participe en un proceso secuencial de reconocimiento de la célula hospedera que precede a la liberación de exoproteínas con actividad catalítica, tales como endopeptidasa o neuroaminidasa, o ambas. Se considera que las adhesinas de *P. haemolytica* constituyen una alternativa como un inmunógeno potencial para el desarrollo de vacunas en contra de la pasteurelosis (Jaramillo *et al.*, 2000).

En estudios recientes en México, Jaramillo *et al.*, (2000), lograron la purificación por afinidad de una adhesina de 68 kDa que fue capaz de aglutinar específicamente eritrocitos de conejo, concluyendo que las adhesinas de *P. haemolytica* juegan un importantísimo papel en la infección. La adhesina de Mh es similar a una adhesina de alto peso molecular caracterizada en cepas no tipificables de *H. influenzae* (Boyce *et al.*, 2004).

### **3.7. Plásmidos**

En Mh se ha podido demostrar la existencia de plásmidos de resistencia a antibióticos; aún cuando la presencia de plásmidos no es un fenómeno característico entre todas las especies, algunas cepas poseen sólo un plásmido pequeño (aproximadamente 4.2 kb), el cual es responsable de la resistencia contra estreptomicina y sulfonamidas (Highlander, 2001; Boyce *et al.*, 2004; Sleim, 2005). En estudios con cepas de Mh A1, en la mayoría de ellas se pudo aislar un plásmido que codificaba una  $\beta$ -lactamasa, sólo unas pocas presentaron dos o ningún plásmido (Murphy *et al.*, 1993). No todos los plásmidos encontrados están asociados con resistencia a antibióticos, paradójicamente fue posible encontrar resistencia en ausencia de plásmidos y algunos de ellos fueron correlacionados con la leucotoxina u otros factores de virulencia (Highlander, 2001; Sleim, 2005).

Los plásmidos juegan un papel muy importante en la estructura genética de resistencia antimicrobiana de Mh. Entre los genes de resistencia a antimicrobianos uno de los más frecuentes en Mh es el de resistencia a sulfonamidas (*suIII*). La mayoría de estos genes se han encontrado en plásmidos de 4.2 a 16.7 kb, algunos de los cuales también generan resistencia contra estreptomicina, kanamicina y tetraciclinas; asimismo, la resistencia a  $\beta$ -lactámicos está asociada a pequeños plásmidos de 4.2 a 5.2 kb; también se ha identificado un pequeño plásmido de menos de 10 kb asociado a resistencia a aminoglicósidos así como uno de aproximadamente 113 kb de resistencia a estreptomicina, kanamicina, tetraciclinas y sulfonamidas; de igual manera, el gen de resistencia a estreptomicina (*strA*) se ha encontrado tanto en plásmidos como en el cromosoma de Mh; la resistencia cloranfenicol está mediada principalmente por las cloramfenicol-acetiltransferasas, muchas de las cuales están localizadas en plásmidos que han sido identificados en Mh (Kehrenberg *et al.*, 2001).

#### **4. Diagnóstico**

Para la detección e identificación de Mh se cuenta con diversas técnicas de laboratorio que incluyen: aislamiento y fenotipificación, serotipificación y genotipificación.

Para el aislamiento y fenotipificación se utiliza el cultivo *in vitro* en medios a base de agar sangre, además de pruebas bioquímicas, todo lo cual permite determinar la morfología de las colonias, la producción de hemólisis, así como su comportamiento bioquímico para efectos de su identificación y biotipificación (Biberstein, 1978; Angen *et al.*, 1999a). Además de los métodos convencionales disponibles para la identificación bioquímica de Mh, se dispone de otros métodos alternativos, que se basan en sistemas miniaturizados comerciales que facilitan y agilizan la fenotipificación, entre estos se encuentra el sistema API 20 E<sup>1</sup> (Analytab Products Inc., por sus siglas en Inglés), el cual ha sido usado ampliamente como una herramienta en la identificación de enterobacterias y no

---

<sup>1</sup> bioMérieux, Inc. Box 15969, Durham, NC 27704-0669/USA.

enterobacterias en medicina veterinaria con resultados muy satisfactorios (Oberhofer, 1979; Swanson and Collins, 1980; Collins and Swanson, 1981; Erasmus, 1983; Villard *et al.*, 2006; Katsuda *et al.*, 2007).

Para la serotipificación se emplean técnicas de hemoaglutinación mediante la utilización de antisueros de referencia específicos para los 17 serotipos reconocidos. Otra prueba serológica que se puede utilizar es la técnica de ensayo visual simple a partir de la obtención de LktA de aislamientos de Mh para determinar la presencia de anticuerpos anti-LktA en el suero de los animales problema. De igual manera, mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia, a partir de proteínas obtenidas de la membrana externa de Mh, que se emplean como antígenos para determinar el patrón de reconocimiento por anticuerpos contra dichos antígenos (Biberstein, 1978).

La variabilidad y complejidad de las características fenotípicas y genotípicas del género *Mannheimia* dificulta en gran medida la clasificación de los aislamientos a través de las técnicas de laboratorio rutinarias, basadas en criterios descriptivos convencionales, que hacen imposible la clasificación taxonómica precisa. Las técnicas clásicas para la identificación de bacterias, tales como la biotipificación, serotipificación, determinación de patrones de susceptibilidad a antibióticos, fagotipificación, se basan en diferencias fenotípicas, no obstante, estas técnicas se ven limitadas por la capacidad de las bacterias de alterar, de manera impredecible, la expresión de algunas de sus características; de tal manera que aislamientos de una misma cepa pueden variar fenotípicamente, adicionalmente, algunos de estos métodos se ven limitados por la relativa gran cantidad de cepas que son fenotípicamente nulas, es decir, no tipificables (Maslow and Mulligan, 1993; Versalovic and Lupski, 2002). Debido a los problemas de tipificación, reproducibilidad y poder discriminatorio asociados a muchos de las técnicas de fenotipificación, han sido desarrollados numerosos sistemas basados en métodos de extracción y uso del ADN, los

cuales inicialmente fueron usados solamente en unos pocos laboratorios de investigación, pero que rápidamente su uso se difundió ampliamente en la práctica clínica (Maslow and Mulligan, 1993).

Para la genotipificación se cuenta con diversas técnicas, entre las cuales se pueden destacar las siguientes: hibridación de ADN-ADN; electroforesis de enzimas multilocus (EEML); ensayo de ADN polimórfico ampliado al azar (APAA) también llamada PCR iniciada arbitrariamente (AP-PCR: Arbitrarily Primed PCR, por sus siglas en inglés) o amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA, por sus siglas en inglés); análisis de restricción para la detección de los genes del ARNr o ribotipificación y, secuenciación del ADN. Todos estos métodos tienen como base el estudio del polimorfismo del ADN bacteriano y se ha demostrado su alto poder de discriminación para la diferenciación de cepas, muy superior a los métodos convencionales de tipificación fenotípica (Maslow and Mulligan, 1993; Versalovic and Lupski, 2002; Angen *et al.*, 1999a; Liu *et al.*, 1999).

La ribotipificación es un método de subtipificación que ha demostrado ser reproducible, altamente discriminatorio, sensible y específico (90%) aplicable con efectividad en procariontes, por medio del cual se pueden obtener impresiones de huellas de ADN de gran utilidad en la identificación, monitoreo y seguimiento de cepas microbianas seleccionadas, en un determinado ambiente<sup>2</sup>. Estas impresiones de huellas de ADN se obtienen a través de la identificación de genes de ARNr altamente conservados mediante el uso de sondas de oligonucleótidos, después de un tratamiento de digestión del ADN genómico con endonucleasas de restricción (Struelens, 1998; Scott *et al.*, 2002; Díaz y Wachter, 2003).

---

<sup>2</sup> Anónimo. Métodos convencionales y moleculares para la identificación y tipificación de *Streptococcus piogenes*. *Enf Infecc Microbiol*, [serie online] 2004 Jul-Sep. Citado 30 Nov 2005; 9 páginas. Disponible en: URL: [http://www.amimc.org.mx/revista/2004/vol\\_24-3/metodos\\_convecionales.htm](http://www.amimc.org.mx/revista/2004/vol_24-3/metodos_convecionales.htm)

Se sabe que los genes ribosomales son altamente conservados en los microorganismos, esto significa que la información genética que codifica el ARNr puede variar mucho menos dentro de una bacteria de la misma cepa que lo que variara entre cepas de bacterias; esta característica ofrece una gran capacidad de distinguir entre diferentes cepas bacterianas<sup>2</sup> (Struelens, 1998; Rodicio y Mendoza, 2004).

A través de la ribotipificación es posible diferenciar entre cepas dentro de una especie o subespecie, debido a que la ubicación de varios sitios de reconocimiento por la enzima de restricción, frecuentemente son polimórficos de una cepa a otra. De esta manera, para cepas diferentes a través de la técnica se logra que la endonucleasa corte el ADN genómico en fragmentos de diferente longitud para genes individuales, produciendo diferentes patrones de bandeo, denominado polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés). Esto se logra mediante electroforesis en geles de agarosa, en los cuales los fragmentos se observan como bandas; este patrón de bandeo corresponde al operón ribosomal (ARNr) y es lo que se conoce como ribotipo (Olive and Bean, 1999; Scott et al., 2002; Díaz y Wachter, 2003).

Estos fragmentos son transferidos a una membrana de nylon (Southern blot); posteriormente, la membrana conteniendo el ADN es hibridizada con una sonda de ADN ribosomal, para finalmente revelar las uniones de la sonda mediante reacciones colorimétricas o radioactivas. Esto permite obtener un patrón que será característico y similar en aquellos aislamientos bacterianos epidemiológicamente relacionados, y distinto en aquellos no relacionados (Olive and Bean, 1999; Scott et al, 2002).

La ribotipificación está basada en la técnica de hibridación, en donde un determinado gen referencial (el ADN ribosomal) se unirá a las secuencias complementarias ubicadas en el ADN genómico del microorganismo evaluado; por lo tanto, el número y la ubicación de las

copias serán representativos para cada aislamiento y para cada especie, proporcionando un perfil característico denominado ribotipo (Struelens, 1998).

La ribotipificación se fundamenta en la diversidad de los genes que codifican el ARN ribosomal entre las especies; estos genes se encuentran presentes en el genoma bacteriano en múltiples copias, cuyo número y localización dependen de la especie. El análisis del perfil ribotípico se basa en examinar y comparar el número y tamaño de bandas entre los aislamientos, permitiendo agruparlos de acuerdo a la coincidencia de sus bandas.

La cantidad de información genética existente entre y dentro de los genes ribosomales es heterogénea en los diferentes aislamientos a lo largo de un periodo de tiempo, se pueden perder o insertar copias de los genes ribosomales o secuencias diferentes, lo que genera que los perfiles sean similares o diferentes, según sea el caso. Esto explica la posibilidad de diferenciar aislamientos epidemiológicamente relacionados mediante la ribotipificación, lo cual se resume en la gran diversidad inter y extra especies que existen entre los genes ribosomales (Scott et al., 2002; Rodicio y Mendoza, 2004).

## **Referencias**

Abdullah KM, Udho EA, Shewen PE, Mellors A. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-Sialoglycoproteins. *Infect and Imm* 1992; 60(1):56-62.

Aguilar RF, Jaramillo ML, Morales AJF, Trigo TFJ, Guemes SF: Evaluación de la protección contra la pasteurelosis neumónica, en corderos vacunados con diferentes antígenos de *Pasteurella hemolytica* A1. *Vet Méx* 1997; 28(3): 221-229.

Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16SrRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen., comb.nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 1999a; 49: 67-86.

Angen O, Quirie M, Donachie W, Bisgaard M. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol* 1999b; 65: 283-290.

Ayalew S, Confer AW, Blackwood ER. Characterization of immunodominant and potentially protective epitopes of *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane lipoprotein PlpE. *Infect Immun* 2004; 72(12): 7265–7274.

Biberstein EL. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Berges and Norris JR. *Methods in Microbiology*. Acade. Press Inc. N.Y.10: 253-269, 1978.

Blanco-Viera FJ, Trigo FJ, Jaramillo-Meza L, Aguilar-Romero F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from México. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1995; 37: 121-126.

Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H, Bisgaard M. Reclassification of [*Pasteurella*] trehalosi as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57: 666-674.

Boyce JD, Lo RYC, Wilkie I, Adler B. *Pasteurella and Mannheimia*. In: Giles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. *Pathogenesis of Bacterial Infectious in Animals*. Carlton, Australia: Blackwell Publishing, 2004: 273-294.

Burrows LL, Olah-Winfield E, Lo CR. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect Immun* 1993; 61(12): 50001-5007.

Carter GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. *Adv Vet Sci* 1967: 321-379.

Colín FR, Jaramillo L, Aguilar F, Trigo FJ, Merino MM. Serotipos de *Pasteurella hemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1987; 29: 231-234.

Collins MT, Swanson EC. Use of the API 20E system to identify non-enterobacteriaceae from veterinary medical sources. *Am J Vet Res* 1981; 42(7): 1269-1273.

Confer AW, Panciera RJ. Testing of two new generation *Pasteurella haemolytica* vaccines experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Agri-Pract* 1994; 15(8):10-15.

Confer AW, Panciera RJ, Gentry MJ, Fulton RW. Immunologic response and resistance to experimental induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 1986; 47(8): 1853-1857.

Confer AW, Ayalew S, Panciera RJ, Montelongo M, Whitworth LC, Hammer JD. Immunogenicity of recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE and augmentation of a commercial vaccine. *Vaccine* 2003; 21: 2821–2829.

Conlon JA, Shewen PE, Lo RYC. Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun* 1991; 59(2): 587-591.

Deshpande, MS, Ambagala TC, Ambagala APN, Kehrlı ME, Srikumaran S. Bovina CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytotoxicity. *Infect Immun* 2002; 70(9): 5058-5064.

Diaz RG, Wachter RC. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev Lat-Amer Microbiol* 2003; 45(1-2): 30-40.

Erasmus JA. The usefulness of the API 20E classification system in the identification of *Actinobacillus actinomycetem comitans*, *Actinobacillus seminis* and *Pasteurella haemolytica*. *Onderstepoort J Vet Res* 1983; 50: 97-99.

Fedorova ND, Highlander SK. Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect Immun* 1997; 65 (7): 2593-2598.

Fodor L, Varga J. Characterisation of a new serotype of *P haemolytica* isolated in Hungary. *Res Vet Sci* 1988; 44: 399.

Frank GH, Tabatabai LB. Neuraminidase activity of *Pasteurella haemolytica* isolates. *Infect Immun* 1981; 32(3): 1119-1122.

Fraser J, Laird S, Gilmour NJL. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci* 1982; 32: 127-128.

Gulig AP, McCracken Jr GH, Frisch CF, Johnston KH, Hansen EJ. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. *Infect Immun* 1982; 37(1): 82-88.

Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia*. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6: 1128-1150.

Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, Panciera R, Alvarez LE, Rinehart C. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect Immun* 2000; 68 (7): 3916-3922.

Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Sieck GC, Maheswaran SK. *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. *Infect Immun* 1998; 66 (6): 2836-2844.

Iovane G, Galdiero M, Vitiello M, Martino De L. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins on bovine neutrophils. *Immun Med Microbiol* 1998; 20: 29-36.

Jaramillo L, Diaz F, Hernández P, Debray H, Trigo F, Mendoza G, Zenteno E. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiol* 2000; 10 (1): 31-37.



Jaramillo ML, Zenteno E, Trigo FJ. Mecanismos de patogenicidad y adherencia de *Pasteurella haemolytica*. Rev Lat-Amer Microbiol 1999; 41: 105-116.

Jaramillo-Arango CJ, Hernández-Castro R, Suárez-Güemes F, Martínez-Maya JJ, Aguilar-Romero F, Jaramillo-Meza L, Trigo FJ. Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico. J Anim Vet Adv 2007; 6 (3): 404-409.

Jaramillo-Arango CJ, Hernández-Castro R, Suárez-Güemes F, Martínez-Maya JJ, Aguilar-Romero F, Jaramillo-Meza L, Trigo FJ. Characterisation of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudates and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. Res Vet Sci 2008; 84: 7-13(Article in press).

Jaworski MD, Hunter DL, Ward ACS. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. Vet Diagn Invest 1998; 10: 49-55.

Jeyaseelan S, Kannan MS, Briggs RE, Thumbikat P, Maheswaran SK. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. Infect Immun 2001; 69 (10): 6131-6139.

Jeyaseelan S, Sreevatsan S, Maheswaran SK. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. Anim Health Res Rev 2002; 3(2): 69-82.

Katsuda K, Kamiyama M, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Eguchi M. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. Vet J 2007; (Article in press).

Kehrenberg C, Schulze-Tanzil G, Martel J-L, Chaslus-Dancla E, Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. Vet Res 2001; 32: 323-339.

Kimura A, Gulig PA, McCracken Jr. GH, Loftus TA, Hansen EJ. A minor high molecular-weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* Type b is a protective antigen. Infect Immun 1985; 47(1): 253-259.

Lafleur RL, Abrahamsen MS, Maheswaran SK. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. Infect Immun 1998; 66(9): 4087-4092.

Lee CW, Shewen PE, Cladman WM, Conlon JA, Mellors A, Lo RY. Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves. Can J Vet Res 1994; 58 (2): 93-8.

Lee CW, Shewen PE. Evidence of bovine immunoglobuline G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>) protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. Can J Vet Res 1996; 60: 127-132.

Leite F, O'Brien S, Sylte MJ, Page T, Atapattu , Czuprynski CJ. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood. *Infect Immun* 2002; 70 (8): 4336-4343.

Lekeu P. Bovine respiratory disease complex. *Ann Med Vet* 1996; 140 (2): 101-105.

Li J, Clinkenbeard KD, Ritchey JW. Bovine CD18 identified as species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet Microbiol* 1999; 76: 91-97.

Liu Sh-L, Schryvers AB, Sanderson KE, Johnston RN. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *J Bact* 1999; 181 (21): 6747-6755.

Lo RYC. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 2001; 83: 23-35.

Marciel AM, Highlander SK. Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and *cis*-acting regulators of leukotoxin. *Infect Immun* 2001; 69 (10): 6231-6239.

Maslow JN, Mulligan ME. Molecular Epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 153-64.

McBride JW, Wozniak EJ, Brewer AW, Naydan DK, Osburn BI. Evidence of *Pasteurella hemolytica* linked immune complex disease in natural and experimental models. *Microb Pathogen* 1999; 26 (4): 183-193.

Morton RJ, Panciera RJ, Fulton RW, Frank GH; Ewing SA, Homer JT, Confer AW. Vaccination of cattle with outer membrane protein-enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. *Am J Vet Res* 1995; 56 (7): 875-879.

Murphy GL, Robinson LC, Burrows GE. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *Clin Microbiol* 1993; 31 (9): 2303-2308.

Nakada H, Inoue M, Numata Y, Tanaka N, Funakoshi I, Fukui S, Mellors A, Yamashina I. Epitopic structure of Tn glycophorin A for an anti-Tn antibody (MLS 128). *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 2495-2499.

Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 2002; 84: 337-356.

Nyarko KA, Coomber BL, Mellors A, Gentry PA. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Vet Microbiol*; 1998: 81-91.

Oberhofer TR. Comparison of the API 20E and Oxi/Ferm Systems in identification of nonfermentative and oxidase-positive fermentative bacteria. *J Clin Microbiol* 1979; 9(2): 220-226.

Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1661-1669.

Pandher K, Murphy G. Genetic and immunological analyses of a 38 Kda surface exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 1996; 51: 331-341.

Pandher K, Confer AW, Murphy GL. Genetic and immunologic analyses of PlpE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Infect and Immun* 1998; 66 (12): 5613-5619.

Pandher K, Murphy GL, Confer AW. Identification of immunogenic, surface-exposed outer membrane proteins of *Pateurella haemolytica* serotipo 1. *Vet Microbiol* 1999; 65 (3): 215-226.

Paulsen DB, Confer AW, Clinkenbeard KD, Mosier DA. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from a neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Vet Res* 1990; 51(10): 1635-1639.

Paulsen DB, Mosier DA, Clinkenbeard KD, Confer AW. Direct effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide of bovine pulmonary endothelial cells in vitro. *Am J Vet Res* 1989; 50(9): 1633-1637.

Pijoan P, Aguilar RF, Morales AF. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet Méx* 1999; 30(2): 149-155.

Pijoan AP, Chávez DJA. Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet Méx* 2003; 34(4): 333-342.

Purdy ChW, Straus DC, Struck D, Foster GS. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasteurellosis. *Am J Vet Res* 1993; 54 (10): 1637-1647.

Rodicio MdeR, Mendoza MdeC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamente, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(4): 238-45.

Sabri MY, Zamri-Saad M, Mutalib AR, Israf DA, Municendy M. Efficacy of an outer membrane protein of *Pateurella haemolytica* A2, A7, or A9 enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet Microbiol* 2000; 73 (1): 13-23.

Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *App Environ Microbiol* 2002, 68(12): 5796-5803.

Shewen PE, Lee ChW, Perets A, Hodgins DC, Baldwin K, Lo RYC. Efficacy of recombinant sialoglycoprotease in protection of cattle against pneumonic challenge with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*A1. *Vaccine* 2003; 21: 1901-1906.

Shewen PE, Wilkie BN. Vaccination of calves with leucotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can J Vet Res* 1988; 52: 30-36.

Sleim RS. Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. Bacteriology Department, Animal Health Research Institute, Nadi El Cairo, Egypt. Jan 2005 [14 screens]. Available from: URL: [http:// www.priory.com/vet/pasteurella.htm](http://www.priory.com/vet/pasteurella.htm).

Squire PG, Smiley DW, Croskell RB. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect Immun* 1984; 45(3): 667-673.

Srinand S, Ames TR, Maheswaran SK, King VL. Efficacy of various vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle: a meta-analysis. *Prev Vet Med* 1995; 25: 7-17.

Straus DC, Jolley WL, Purdy ChW. Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun* 1993a; 61(11): 4669-4674.

Straus DC, Unbehagen PJ, Purdy ChW. Neuraminidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. *Infect Immun* 1993b; 61(1): 253-259.

Straus DC, Purdy ChW. In vivo production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* A1 in goats after transthoracic challenge. *Infect Immun* 1994; 62(10): 4675-4678.

Struelens MJ. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: Current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93(5): 581-585.

Swanson EC, Collins MT. Use of the API 20E system to identify veterinary *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1980; 12(1): 10-14.

Trigo TFJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cien Vet.* 1987; 4: 1-36.

Trigo TFJ. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurellosis pulmonar bovina. *Vet Méx* 1991; XXII(2): 131-134.

Versalovic J, Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol* 2002; 10(10): 15-21.

Villard L, Gauthier D, Lacheretz A, Abadie G, Game V, Maurin F, Richard V, Borges E, Kodjo A. Serological and molecular comparison of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* strains isolated from wild and domestic ruminants in the French Alps. *Vet J* 2006; 171(3): 545-550

Wang Z, Clarke C, Clinkenbeard K. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. *Infect Immun* 1998; 66 (5): 1885-1890.

Wray BC, Thompson DA. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. Br Vet 1971; 127: lxvi-lxvii.

Younan M, Fodor L. Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). Res Vet Sci 1995; 58: 98.

Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005; 36: 133-156.

## **CAPÍTULO III**

### **Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico.**

CJ. Jaramillo-Arango, R. Hernández-Castro, F. Suárez-Güemes, JJ. Martínez-Maya, F. Aguilar-Romero, L. Jaramillo-Meza, FJ. Trigo

**Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico.**

<sup>1</sup>\*C.J. Jaramillo-Arango, <sup>1</sup>R. Hernández-Castro, <sup>1</sup>F. Suárez-Güemes, <sup>1</sup>J.J. Martínez-Maya, <sup>2</sup>F. Aguilar-Romero <sup>2</sup>L. Jaramillo-Meza and <sup>1</sup>F.J. Trigo

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510; Mexico.

<sup>2</sup>CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Palo Alto, México, D.F., 05110; Mexico.

**Abstract:** *Mannheimia spp.* strains obtained from bovine nasal exudates of either clinically healthy (n= 1902) or infected with pneumonia animals (n= 189) were isolated and characterised to estimate the prevalence of isolated serotypes, and to identify some factors associated to prevalence in dairy farms in Mexico, by means of a transectional descriptive study. Strains were isolated and typified through conventional *in vitro* culture methods, biochemical and immunological tests. Chi square or Fisher statistical tests were applied, as well as odds ratio calculation and logistic regression analysis to evaluate the association and effect of some variables on *Mannheimia spp.* isolation. Isolates were composed in 48% by serotype A1, in 2.4% by A6 and 49.3% were non-typable. The apparent prevalence rates of *Mannheimia haemolytica* were significantly higher in diseased bovines (OR = 2.54; p<0.05), as well as in bovines younger than 1 year of age (OR = 2.26; p<0.05). Health condition and age were the variables that remained in the logistic regression model. Serotype A1 showed the highest prevalence, even when most isolates were not-typable. Bovines younger than one year of age and those with respiratory disease were the groups with the highest frequency of *M. haemolytica* isolates.

**Key words:** *Mannheimia* serotypes, bovine mannheimiosis, prevalence, Mexico.

**\*Corresponding Author:** Carlos Julio Jaramillo-Arango, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Publica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510. E-mail: cja@servidor.unam.mx

## INTRODUCTION

*Pasteurella haemolytica* A serotypes were reclassified into new genus *Mannheimia*, and the A serotypes of *P. haemolytica* (A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 and A17) were renamed *M. haemolytica* (*Mh*). Serotype A11 was reclassified into the new species *M. glucosida* (*Mg*) [1,2].

*Mh* is present in the nasopharynx and tonsils of apparently healthy animals [3], this microorganism is the one most frequently associated to bovine pneumonic pasteurellosis, called shipping fever pneumonia, affecting mainly animals younger than one year of age, recently transported or added to the herd during the first year of live [4,5]. It is also considered the disease most relevant in terms of economic aspects in the bovine industry worldwide [6].

The predominant serotype recovered from healthy calves or pneumonic lesions in cases of shipping fever is *Mh* A1, though serotypes A2, A5, A6, A7, A9, A11, A12 and A14 are sometimes recovered [7,8].

Studies performed in Mexico since the 1980s report that A1 and A2 are the most frequent serotypes in pneumonic lungs or in clinically healthy bovines [9,10,11].

Considering that *Mh* is the main bacterial pathogen of bovine pneumonic pasteurellosis [6,12], for the purpose of this study, we will refer to the latter as mannheimiosis along the text.

In Mexico, there has been no overall epidemiological evaluation of ruminant pneumonia and no reliable information is available on the prevalence and characterisation of the main bacterial species responsible for pneumonia in bovines [10]. In addition, available information on incidence and prevalence in bovines is hardly reliable and very scarce and unclear, which renders its analysis very difficult.

The objective of the present study was to isolate the strains of *Mannheimia spp* from nasal exudates of clinically healthy pneumonia-free (H) and clinically diseased with pneumonia



(D) bovines, and to determine the prevalence of the different isolated serotypes and some factors associated with their prevalence in 320 dairy farms located in the Comarca Lagunera in the States of Coahuila and Durango, Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area

The Comarca Lagunera is a semidesert region in North-Central Mexico located at 24° 22' N, 102° 22' W, constituted by 11 counties in the State of Durango and 5 counties in the State of Coahuila <sup>[13]</sup>. It is the most important dairy region of Mexico with 2,081,000 litres of milk production annually, representing 20% of the domestic milk production, and a dairy cattle population of approximately to 440,876 <sup>[14]</sup>.

### Sampling design

The Comarca Lagunera has 320 dairy farms (DF) and an average of 2500 bovines per DF. With a sample frame constituted by 216 DF, a random two-stage sampling was used according to the method proposed by Segura and Honhold <sup>[15]</sup>. During the first stage, to obtain an estimated prevalence value to calculate sample size, a simple random pilot sampling was performed on 10% of the DF (more than 10% of non-responsive) (n=24 DF). With the estimated prevalence values obtained in the pilot sampling, we calculated the parameters required to estimate the minimum sample size per conglomerate (dairy farm) of random sampling, with the following equation <sup>[15]</sup>:

$$n = \frac{t^2 s_b^2}{d^2} = 1707.6$$

where  $t$  is the critical value of the Student's  $t$  table, with an infinite number of degrees of freedom (confidence level of 95%),  $S_b^2$  is the total variance that include the variance among and within conglomerates, and  $d$  is the desired precision (3%).

The number of DF (n= 36) to be sampled was obtained by dividing the total sample size (1707.6) between the mean of animals sampled within each DF (48), and in a second stage, it was decided to sample 20 DF, which added to the 24 of the first stage gave a total of 44 DF. Samples of 2% of the H-bovines were obtained from each of the 44 DF (n= 1902), always verifying that 70% were less than 1 year old, because of the greater susceptibility of this age group to pneumonic problems. Additionally, samples were obtained from 100% of the D- bovines (n=189).

### **Sampling**

We considered animals as clinically diseased with pneumonia (D) those presenting clinical manifestations of an undifferentiated respiratory disease, such as: nasal discharge, coughing, hyperpnoea or dyspnoea, pyrexia and retarded growth. Those animals not presenting these clinical manifestations were considered clinically healthy pneumonia-free (H).

Samples were obtained from the deep nasal cavity of H- (n=1902) and D-bovines (n=189) by rotation of a sterile cotton swab (Copan Venturi Transystem, Copan, Italy) with Amies medium and activated charcoal. These were kept under refrigeration for no more than 24 h until processed at the bacteriology laboratory of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP).

### **Strain isolation and identification**

Cotton swabs were cultured by inoculation in blood agar and 5% sheep blood (BBL, Becton Dickinson) and incubated at 37°C for 24h. Phenotype identification of colonies with typical appearance of *Mannheimia spp.* was done by conventional methods of gram-staining and biochemical tests (oxidase, carbohydrate fermentation and sulfhydic acid production [TSI], citrate utilisation, motility and indole production, urease production,

trehalose and aesculine fermentation). A single representative colony was chosen for evaluation. These colonies were sub-cultured in blood agar (5% sheep blood) (37°C/24 h) and pure cultures of the strain were obtained. Final identification was done with the API 20E bacterial identification system (bioMérieux, Durham, NC, USA. Inc). Briefly, cultures were resuspended in 5 mL of a sterile suspension medium at a density of 4.0 on the McFarland scale. The suspension was transferred to the biochemical test strips and reactions were read after incubation at 37°C for 24 h, according to manufacturer's instructions. All stated biochemical tests were also applied to reference strains of *Mh* (Strains 1, 2, 5-9, 11, 12) and *P. trehalosi* (Strains 3,4,10) (kindly donated by Dr. GH Frank and Dr. B. Briggs, NADC, USDA).

Results of the profile of each strain were compared with the profiles of the taxa in the data base contained in the Program APIWEB (<http://www.biomerieux.com>). In addition, the phenotypical properties of *Mannheimia spp.* described by other authors <sup>[1,16]</sup> were taken into account (Table 1).

According to the threshold values proposed by the API 20E system, it was considered that strains with an identification percentage (%ID) under 80% had an unacceptable profile (UP), with a %ID above 80% they belonged to the same genus (*Mannheimia spp.*), and with a %ID above 90% to the same species (*Mh*).

### **Serologic typification**

This was performed by the IHA technique described by Biberstein <sup>[17]</sup> and monospecific antisera against capsular antigens (1-17) of *Mannheimia spp.* were used (kindly donated by Dr. GH Frank and Dr. B. Briggs, NADC, USDA). Agglutinations with titres above 1:64 were considered positive. Each plate included a positive and a negative control.

### **Identification of factors associated to *Mannheimia spp.* prevalence**

A questionnaire was designed and applied at each of the sampled DPU (n=44) with the purpose of identifying some variables probably associated to the epidemiology of mannheimiosis, among which were included: animal age, calf accommodations, vaccines applied to prevent diseases of the respiratory tract (infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine syncytial virus and mannheimiosis), as well as to determine the degree of association with *Mannheimia spp.* prevalence.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was done with the Epi Info<sup>®</sup>, Version 3.3.2 program (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 2004). Data were used to calculate prevalence rates. In addition, the Chi square or Fisher tests were applied depending on the data characteristics to evaluate associations, and OR were calculated to determine the degree of association. A logistic regression analysis was applied to evaluate the joined effect of the variables, in which the dependent variable was isolation or no isolation of *Mannheimia spp.* Only variables with a  $\leq 0.1$  probability of error obtained by univariate analysis with Chi square were selected, and those with  $P \leq 0.05$  to remain in the model.

## **RESULTS**

### **Strain isolation and typification**

All isolates (n=127) were gram-negative, haemolytic, non-mobile coccobacilli, positive to cytochrome-oxidase production, to nitrate and nitrite reduction, and to D-glucose, D-sucrose and D-mannitol fermentation, and negative to the following tests: arginine dehydrolase, lysine decarboxylase, ornitine decarboxylase, citrate utilization, sulfhydic acid production, tryptophan deaminase, urease, and indole gelatinase production, trehalose,

L-rhamnose, D-melibiose, L-arabinose fermentation and McConkey agar growth. Variations were found in the percentages of isolates positive to some tests (Table 2).

According to the threshold values established by the API 20E system, of the 127 analysed strains, 126 (99.2%) showed a %ID above 90%, and thus corresponded to *Mh*, and 1 (0.78%) showed a %ID above 80%, corresponding to *Mannheimia spp.* genus.

### **Serotyping**

Of the 127 isolates, 61 strains (48%) were serotype A1, 3 (2.4%) were serotype A6 and 63 strains (50.1%) were non-typable (NT). All strains identified as A1, and A6, and 62 NT showed phenotypic properties with %ID above 90%, and 1 strain NT showed phenotypic properties with %ID above 80% according to other authors <sup>[1,16]</sup>. In the H-animals 51.4% were A1; 2.9%, A6; and 46%, NT; in D-animals, 33% were A1; and 67%, NT. The differences in the frequency among serotype isolates in H- and D-bovines were significant ( $p \leq 0.05$ ) with the Chi square test.

### **Isolate prevalence rates**

In H-bovines (n= 1902), 103 isolates were obtained; in D-bovines (n= 189), 24 isolates were obtained. In H-bovines, the apparent prevalence rate (APR) of *Mh* was 5.4% (CI<sub>95%</sub> 4.3% to 6.4%), in D-bovines it was 12.7% (CI<sub>95%</sub> 7.9% to 17.4%). The differences between TPA in H-and D-bovines were significant ( $r= 2.2$ , CI<sub>95%</sub> 1.24 to 3.23) with the independent rates analysis.

### **Associated factors**

Among the associated factors, statistical significance in the frequency of *Mh* isolations was only found in relation with health conditions and age group (Table 3). *Mh* isolation frequency was higher in: a) D-bovines than in H-bovines (OR= 2.54 [1.54 – 4.16]) ( $p <$

0.05) and b) in bovines younger than one year than in older animals (OR= 2.26 [1.36 – 3.8]) (p < 0.05). The variables of age and health condition were included in the logistic regression analysis, and both of them remained in the model (Table 4).

## DISCUSSION

Aimed at obtaining a more reliable phenotypic characterization of the isolates, we performed conventional biochemical tests aside from the API 20 system to provide support to the serotyping, considering that some authors claim that serotyping by IHA alone is not sufficiently specific for reliable identification of *M. haemolytica*, if not supported by several biochemical tests, since the genus *Mannheimia* includes phenotypically and genotypically very heterogeneous taxa [2,16].

No other bovine nasal exudate studies have been performed in Mexico, the highest prevalence of serotype A1 among serotypable strains in the H- (51.4%) and D- (33%) bovine groups agrees with reports from other authors, who describe this serotype as the most frequent in bovines [3,8]. Prevalence in the H-bovines was similar to the 50% found in nasal exudates of healthy calves by Wray and Thompson [8] in Great Britain. Frank and Smith [18] showed that the A1 serotype predominates in calves transported to auction barns and feed-yards, and Rowe et al. [3] have also reported serotype A1 as the most frequent in tracheobronchial washings of bovines.

The present is the first isolation of the A6 serotype from bovine nasal exudates in Mexico, since A6 has only been reported in ovine and bovine lungs [9,19]. In other countries, serotype A6 has been reported in ovine lungs in Great Britain [20], Ethiopia [21], Turkey [22], and in bovine lungs in the United States of America [12].

In the present study, the frequency of NT strains, in both H- (46%) and D- (67%) animals is higher than the frequencies found by other national and international authors. Frequencies

of 14.6% NT strains have been reported in nasal exudates of ovines in Mexico <sup>[23]</sup>, and 9.3% of NT strains have been reported in calves in Great Britain<sup>[8]</sup>.

Frequencies of NT strain isolates are very variable and can sometimes be high <sup>[24]</sup>, and differ depending on the source of isolation: Great Britain reports 24% in pneumonic calves lungs <sup>[7]</sup>, Denmark, 25% <sup>[16]</sup>; United States, 15.8% in sheep nasal exudates <sup>[18]</sup>; Ethiopia, 3.6% <sup>[21]</sup>, Hungary, 7% <sup>[25]</sup>; and Turkey, 8.3% <sup>[22]</sup> in ovine lungs. These NT strains normally correspond to the A biotype <sup>[26]</sup>, and have been described as *Mh* mutants, some of which are deficient in soluble antigen production <sup>[27]</sup>.

It has been stated that isolates frequency is low in nasal cotton swabs of healthy, non-stressed animals, and high in calf with respiratory tract disease <sup>[28]</sup>. This agrees with the prevalence values found in this study, which were higher in D- animals.

Information on frequency, prevalence, and incidence is scarce and unclear in Mexican studies. In calves, incidence ranges from 19.7 to 39.9% <sup>[29]</sup>, or frequency from 29 to 49% of *P. haemolytica* serotypes in sera <sup>[11]</sup>, 12% *P. haemolytica* isolates in ovine nasal exudates <sup>[23]</sup>, and 25 to 35% in ovine or calf lungs <sup>[9,10,19]</sup>. These studies were performed with intentional samples mostly obtained at diagnostic centres, slaughterhouses, and to a lesser degree at livestock units. They are not sufficiently representative of reference populations, neither in quality nor in quantity, so that rates do not allow valid inferences concerning these populations.

In the present study, random sampling of the reference population and the isolate frequencies obtained constitute the APR, which allowed to infer, with a 95% confidence index, the actual prevalence rates (RPR). In H-bovines, RPR values for *Mh* range from 4.3 to 6.4%; and in D- bovines, they range from 7.9 to 17.4%.

The present results are only partially comparable with other national and international studies, since the samples used in other studies are different in origin and characteristics. In

H-bovines, the *Mh* APR (5.4%) obtained was lower than that found in calf nasal exudates by Frank and Smith <sup>[28]</sup> (17%), Wray and Thompson <sup>[8]</sup> (87.7%), and that reported by Argueta et al. <sup>[23]</sup> (12%) in ovine nasal exudates. In D-bovines, *Mh* APR (12.7%) was lower than the 25% frequency reported by Zanabria et al. <sup>[30]</sup> in bovine nasal exudates and similar to that found by Sisay and Zerihun <sup>[21]</sup> in ovine nasal exudates (13%).

No previous studies have been published in Mexico concerning the evaluation of *Mh* and its distribution pattern with respect to predisposing factors, such as age, health conditions, or other determining factors. Most studies, national and international, concentrate on the clinical aspects and pathogenicity of the *Mannheimia* genus.

The higher frequency of *Mh* isolates in D- than in H-bovines (OR= 2.54 [1.54-4.16]), and in bovines under one year of age than in older animals (OR= 2.26 [1.36-3.8]), confirms that isolates of the genus *Mannheimia* are more frequent in young, especially under one year of age, and diseased animals, because they are consistently the most exposed groups. This agrees with statements by other authors <sup>[8]</sup>.

Differences in *Mh* isolation frequency according to the type of calf accommodations were in no case significant. There are doubtlessly other confounding variables that intervene such as: management, hygiene, colostrum quality and supply, and weather conditions, which should be evaluated in more detail. The influence of the type of accommodations in the presence of pneumonia is controversial <sup>[29]</sup>. It has been reported that there are no significant differences if calves are indoors or outdoors regarding health <sup>[31]</sup>, and no association between health and cage dimensions or materials have been found<sup>[32]</sup>. All other analysed variables showed no significant differences or consistency to allow comparisons or solid conclusions.

These results allow us to conclude that the isolates obtained in this study, together with those of another study we are currently performing in a different region of Mexico



(unpublished results), constitute the most representative collection of *Mannheimia* strains of bovine origin in the country. Most isolates were NT, followed by the A1 serotype as the most frequent; confirming other reports <sup>[7,18]</sup>. According to the APR, bovines younger than one year of age and those with pneumonic disease were the groups with the highest frequency of *Mh* isolates.

Further studies are underway with molecular biology techniques for definitive identification of the isolated strains.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

CJ Jaramillo-Arango received scholarship No. 180224 from CONACyT (Mexican National Council for Science and Technology). This study was financed by CONACyT (Project G38590-B). We thank the livestock breeders of the dairy farms in the Comarca Lagunera, Mexico, for supplying the cattle and farm facilities, Dr. GH Frank and Dr. B. Briggs for providing the strains and monospecific antisera against capsular antigens of *M. haemolytica* and *P. trehalosi*.

## REFERENCES

1. Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16SrRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen., comb.nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia gDPUcosa* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 1999a; 49: 67-86.
2. Angen O, Quirie M, Donachie W, Bisgaard M. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol* 1999b; 65: 283-290.
3. Rowe HA, Poxton IR, Donachie W. Survival of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Vet Microbiol* 2001; 81: 305-314.
4. Murphy GL, Robinson LC, Burrows GE. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *Clin Microbiol* 1993; 31 (9): 2303-2308.
5. Trigo TFJ: Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Vet Méx* 1991; XXII(2): 131-134.
6. Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 2002; 84: 337-356.
7. Quirie M, Donachie W, Gilmour NJL. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet Rec* 1986; 119, 93-94.
8. Wray BC, Thompson DA. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. *Br Vet* 1971; 127: lxvi-lxvii.
9. Blanco-Viera FJ, Trigo FJ, Jaramillo-Meza L, Aguilar-Romero F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from México. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1995; 37: 121-126.
10. Pijoan P, Aguilar RF, Morales AF. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet Méx* 1999; 30(2): 149-155.
11. Sánchez MPH, Morales AJF, Zepeda M de OO, Espino RG, Trigo TFJ. Determinación de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *Pasteurella haemolytica* en suero de bovinos y caprinos. *Téc Pec Méx* 1988; 26(2): 192-202.
12. Al-Ghamdi GM, Ames TR, Baker JC, Walker R, Chase CC, Frank GH, Maheswaran SK. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12(6): 576-8.
13. INEGI. 2006. Información Geográfica. Sistemas Nacionales Estadístico y de Información Geográfica. Instituto Nacional de Geografía e Informática. México. Available at URL: <http://www.inegi.gob.mx/inegi/default.asp>.
14. SAGARPA. 2006. Resumen Nacional de la Producción Pecuaria. Avance Mensual. 2005. Servicio de Información Estadística, Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. Available at URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/sagar3.htm>.
15. Segura JC, Honhold N. Método available at s de muestreo para la producción y la salud animal. México: Universidad Autónoma de Yucatán, 2000.

16. Angen O, Ahrens P, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microb* 2002; 84: 103-114.
17. Biberstein EL. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Berges and Norris JR. *Methods in Microbiology*. Acade. Press Inc. N.Y.10: 253-269, 1978.
18. Frank GH. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the Midwestern United States. *Am J Vet Res* 1982; 43(11): 2035-2037.
19. Blanco VFJ, Trigo TFJ, Jaramillo ML, Aguilar RF, Tapia PG, Suarez GF: Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet Méx* 1993; 24(2): 107-112.
20. Fraser J, Gilmour NJL, Laird WS. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* serotypes isolated from ovine pasteurellosis in Britain. *Vet Rec* 1982a; 110: 560-561.
21. Sisay T, Zerihun A. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the Highlands of Wollo, North East Ethiopia. *Vet Res Communic* 2003; 27(1): 3-14.
22. Kirkan S and Kaya O. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* strains pneumonic DPUs of sheep in the Aydin Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29: 491-494.
23. Argueta, GJ, Mercado PM, Trigo TFJ: Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. *Vet Méx* 1988; 19: 93-97.
24. Fraser J, Laird S, Gilmour NJL. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci* 1982b; 32: 127-128.
25. Fodor L, Varga J. Characterisation of a new serotype of *P haemolytica* isolated in Hungary. *Res Vet Sci* 1988; 44: 399.
26. Frank GH. Serological groups among untypable bovine isolates of *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 579-582.
27. Gentry MJ, Confer AW, Holland SG. Comparison of the toxic and antigenic properties of single bovine isolates of *Pasteurella haemolytica* representing five serotypes and an untypable strain. *Vet Microbiol* 1988; 16: 351-367.
28. Frank GH, Smith PC. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am J Vet Res* 1983; 44 (6): 981-985.
29. Pijoan AP, Chávez DJA. Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet Méx* 2003; 34(4): 333-342.
30. Zanabria V, Rivera GH, Rosadio AR. Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. *Rev Inv Vet Perú* 2000; 11(12): 169-187.
31. Jorgenson LJ, Jorgensen NA, Schingoethe DJ, Owens MJ. Indoor versus outdoor calf rearing at three weaning ages. *J Dairy Sci* 1970; 53 (6): 813-817.
32. Fisher LJ, Peterson GB, Jones SE, Shelford JA. Two housing systems for calves. *J Dairy Sci* 1985; 68: 368-373.

Table 1: Phenotypic reactions characterising the different species in the *Mannheimia* genus.\*

Test	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. glucosida</i>	<i>M. varigena</i>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M. ruminalis</i>
Mannitol	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+/-
D-Xilose	+	+	+	+/-	+/-
D-Sorbitol	+	+	-	+	+/-
$\alpha$ -fucosidase (ONPF)	+	+	+/-	-	-
Haemolysis	+	+	+	-	-
$\beta$ -galactosidase (ONPG)	+/-	+	+/-	+/-	+
$\beta$ -glucosidase (NPG)	-	+	+/-	+	-
Glycosides <sup>a</sup>	-	+	-	+/-	-
L-Arabinose	-	+/-	+	-	-
Ornithine decarboxylase	-	+/-	+/-	-	-
Indole	-	-	+/-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-

\* Angen et al., 1999a; Angen et al., 2002.

+: positive ; -: negative; +/-: positive or negative

<sup>a</sup> Amygdalin, aesculin, arbutin, cellobiose, gentobiose, and salicin.

Table 2: Phenotypic characteristics of *Mannheimia spp.* strains isolated in bovines from dairy farms in the North-Central of Mexico.

Phenotypic characteristics	Positive %
Haemolysis	100
Cytochrome oxidase	100
Nitrate reduction	100
D-glucose	100
D-sucrose	100
D-mannitol	100
$\beta$ -galactosidase (ONPG)	100
Inositol	39.4
D-sorbitol	32.3
Amygdalin	0.78
Aesculin	0
Motility	0
Voges Proskauer	0
MacConkey medium growth	0
Gelatinase	0
Lysine descarboxylase	0
Arginine dehydrolase	0
Ornithine decarboxylase (ODC)	0
Citrate	0
Indole	0
H <sub>2</sub> S	0
Urease	0
Tryptophane deaminase	0
Trehalose	0
L-rhamnose	0
D-melibiose	0
L-arabinose	0

Table 3: Factors associated with *M. haemolytica* isolates in bovines from dairy farms in the North-Central of Mexico.

Associated factors	OR (CI 95%)	p
Diseased vs. healthy	2.5 (1.5 – 4.1)	<0.001
Age under 1 vs. over 1	2.2 (1.4 - 3.8)	<0.001
Outdoors vs. indoors	1.7 (0.6 – 4.9)	0.242
Individual vs. group	2.5 (0.7 – 9.9)	0.170
Vaccinated Yes vs. No	2.3 (0.5 – 14.7)	0.161

OR, Odds ratio and confidence interval 95%; p, significant difference ( $p \leq 0.05$ ) or not significant ( $p > 0.05$ ) to Chi square or Fisher tests.

Table 4: Logistic regression model for *M. haemolytica* isolation in bovines from dairy farms in the North-Central of Mexico.

Risk factor	$\alpha$	$\beta$	OR	CI 95%	P
Age <sup>a</sup>	-3.45	0.77	2.17	1.33 – 3.53	< 0.001
Health conditions <sup>b</sup>	-3.45	0.87	2.39	1.49 - 3.85	<0.001

<sup>a</sup> Age under 1 vs. over 1, <sup>b</sup> Diseased vs. healthy

## **CAPÍTULO IV**

### **Characterisation of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudates and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico.**

CJ. Jaramillo-Arango, R. Hernández-Castro, F. Suárez-Güemes, JJ. Martínez-Maya, F. Aguilar-Romero, L. Jaramillo-Meza, FJ. Trigo

*Research in Veterinary Science*, 84: 7-13, 2008 (Article in press)



**Characterisation of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudate and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico.**

**C.J. Jaramillo-Arango<sup>a</sup>, R. Hernández-Castro<sup>a</sup>, F. Suárez-Güemes<sup>a</sup>, J.J. Martínez-Maya<sup>a</sup>, F. Aguilar-Romero, L. Jaramillo-Meza<sup>b</sup> and F.J. Trigo<sup>a,\*</sup>**

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

<sup>1</sup> CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Palo Alto, D.F., 05110.

Accepted 30 March 2007

---

**Abstract**

*Mannheimia* spp. strains obtained from bovine nasal exudates of either clinically healthy or clinically affected by respiratory tract disease animals were isolated and characterised to estimate the prevalence of isolated serotypes in dairy farms in Mexico, by means of a transectional descriptive study. Strains were isolated and typified through biochemical and immunological tests. Chi square or Fisher statistical tests were applied, as well as odds ratio calculation and logistic regression analysis to evaluate the association and effect of some variables on *Mannheimia* spp. isolation. The apparent prevalence rates of *M. haemolytica* was significantly higher in diseased bovines (OR = 1.94; p<0.05), as well as in bovines younger than 1 year of age (OR = 23.98; p<0.05), and in bovines not vaccinated against bovine pasteurellosis (OR = 1.52; p<0.05). Age was the variable that remained in the logistic regression model. Serotype A1 showed the highest prevalence, even when most isolates were not-typable. Bovines younger than one year of age and those with disease were the groups with the highest frequency of *M. haemolytica* and *M. glucosida* isolates.

*Keywords:* *Mannheimia*; Bovine mannheimiosis; Cattle.

---

**1. Introduction**

*Pasteurella haemolytica* was classified into biotypes A and T according to its ability to ferment arabinose or trehalose, respectively, and the *P. haemolytica* complex negative to trehalose was reclassified into the new genus *Mannheimia*, which includes at least five species: *M. haemolytica*, *M. granulomatis*, *M. glucosida*, *M. ruminalis* and *M. varigena* (Angen et al., 1999a). The A serotypes of *P. haemolytica* (A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16

---

\* Corresponding autor: Tel: +52 555 56225858; fax: +52 555 556225931  
E-mail address: [cja@servidor.unam.mx](mailto:cja@servidor.unam.mx) (C.J. Jaramillo-Arango)

and A17) were renamed *M. haemolytica*. Serotype A11 was reclassified into the new species *M. glucosida* (Angen et al., 1999a; Angen et al., 1999b).

*M. haemolytica* is present in the nasopharynx and tonsils of apparently healthy animals (Rowe et al., 2001; Narayanan et al., 2002) and this microorganism is the most pathogenic and most frequently associated to bovine respiratory diseases, particularly to bovine pneumonic pasteurellosis or shipping fever pneumonia affecting mainly animals younger than one year of age, recently transported or added to the herd (Trigo, 1991; Murphy et al., 1993). It is also considered the disease most relevant in terms of economic aspects in the bovine industry (Narayanan et al., 2002).

Most strains of *M. glucosida* have been isolated from the nasal cavity of healthy ovines (Angen et al., 1999b; Argueta et al., 1988), but can be isolated from healthy bovines (Wray and Thompson, 1971), and from cases of pneumonia or other diseases of both ovine (Sisay and Zerihun, 2003) and bovine (Al-Ghamdi et al., 2000; Narayanan, 2002) livestock.

The etiology of shipping fever pneumonia is multifactorial and several risk factors are involved. Among the most prominent risk factors are those related to animal handling that generates stress, as well as the participation of other infectious agents, particularly primary agents of viral nature, such as syncytial virus, parainfluenza 3, infectious bovine rhinotracheitis (Herpes virus 1) and, occasionally, adenovirus (Trigo 1991; Murphy et al., 1993; Narayanan et al., 2002).

Considering that *M. haemolytica* is the main bacterial pathogen of bovine pneumonic pasteurellosis (Al-Ghamdi et al., 2000; Narayanan, 2002), for the purpose of this study, we will refer to the latter as mannheimiosis along the test.

Studies performed in Mexico since the 1980s report that A1 and A2 are the most frequent serotypes in pneumonic lungs in bovines (Blanco-Viera et al., 1995; Pijoan et al., 1999),

and A1, A2 and A5 in pneumonic lungs or in clinically healthy ovines (Colin et al., 1987; Argueta et al., 1988; Blanco et al., 1993; Blanco-Viera et al., 1995)

In Mexico, there has been no overall epidemiological evaluation of ruminant pneumonia. In addition, information on incidence and prevalence is hardly reliable (Pijoan et al., 1999), and very scarce and unclear, which renders its analysis very difficult.

The objective of the present study was to isolate the strains of *Mannheimia* spp. from nasal exudates of clinically healthy (CH) and clinically affected by respiratory tract disease (CA) bovines, and to determine the prevalence of the different isolated serotypes and of some factors associated with prevalence in 120 dairy farms located in the Central Valley of Mexico.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Study area*

The study was performed in 120 dairy farms, with an average of 200 animals each, all concentrated and neighbouring in a geographical space, forming a dairy production complex, located in the Central Valley of Mexico.

### *2.2. Sampling design*

Random two-stage sampling was used according to the method proposed by Segura and Honhold (2000). During the first stage, to obtain an estimated prevalence value to calculate sample size, a simple random pilot sampling was performed on 10% of the dairy farms (DF) (more than 3% of non-responsive) ( $n = 16$  DF).

With the estimated prevalence values obtained in the pilot sampling, we calculated the parameters required to estimate the minimum sample size per conglomerate (dairy farm) random sampling, with the following equation (Segura and Honhold, 2000):

$$m = \frac{Mt^2s_c^2}{MN^2d^2 + t^2s_c^2}$$

where  $M$  is the number of conglomerates (DF) in the population,  $s_c^2$  is the variance among conglomerates,  $t$  is the critical value of the Student's  $t$  table, with an infinite number of degrees of freedom,  $d$  is the desired precision, and  $N$  is the mean number of elements in the conglomerate (DF).

A minimum sample size of 35 DF was obtained, and in a second stage, it was decided to sample 21 DF, which added to the 16 of the first stage gave a total of 37 DF. Samples of 10% of the CH bovines were obtained from each of the 37 DF ( $n = 680$ ), always verifying that 70% were less than 1 year of age, because of the greater susceptibility of this age group to pneumonic problems. Additionally, samples were obtained from 100% of the CA bovines ( $n = 193$ ).

### 2.3. Sampling

We considered animals as clinically affected by respiratory tract disease (CA) those presenting clinical manifestations of an undifferentiated respiratory disease, such as: nasal discharge, coughing, hyperpnoea or dyspnoea, pyrexia and retarded growth. Those animals not presenting these clinical manifestations were considered clinically healthy (CH).

Samples were obtained from the deep nasal cavity of CH ( $n = 680$ ) and CA bovines ( $n = 193$ ) by rotation of a sterile cotton swab (Copan Venturi Transystem, Copan, Italia) with Amies medium and activated charcoal. These were kept under refrigeration for no more than 24 h until processed at the bacteriology laboratory of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP).

#### 2.4. Strain isolation and identification

Cotton swabs were cultured by inoculation in blood agar and 5% sheep blood (BBL, Becton Dickinson) and incubated at 37°C for 24h. Phenotype identification of colonies with typical appearance of *Mannheimia spp* was done by conventional methods of Gram staining and biochemical tests (oxidase, carbohydrate fermentation and sulfhydic acid production (TSI), citrate utilization, motility and indole production, urease production, trehalose and aesculine fermentation). A single representative colony was chosen for evaluation. These colonies were sub-cultured in blood agar (5% sheep blood) (37°C/24h) and pure cultures of the strain were obtained. Final identification was done with the API 20E bacterial identification system (bioMerieux, Durham, NC, USA. Inc.). Briefly, cultures were resuspended in 5 ml of sterile suspension medium at a density of 4.0 on the McFarland scale. The suspension was transferred to the biochemical test strips and reactions were read after incubation at 37°C for 24 h, according to manufacturer's instructions. All stated biochemical tests were also applied to reference strains of *M. haemolytica* (Strains 1, 2, 5-9, 11, 12) and *P. trehalosi* (Strains 3, 4, 10) (kindly donated by Dr. GH Frank and Dr. B. Briggs, NADC, USDA).

Results of the profile of each strain were compared with the profiles of the taxa in the data base contained in the Program APIWEB (<http://www.biomerieux.com>). In addition, the phenotypical properties of *Mannheimia spp.* described by other authors (Angen et al., 1999a; Angen et al., 2002) were taken into account (Table 1).

According to the threshold values proposed by the API 20E system, it was considered that strains with an identification percentage (%ID) under 80% had an unacceptable profile (UP), with a %ID above 80% they belonged to the same genus (*Mannheimia spp.*), and with a %ID above 90% to the same species (*M. haemolytica*).

### 2.5. Serologic typification

This was performed by the IHA technique described by Biberstein (1978) and monospecific antisera against capsular antigens (1-17) of *Mannheimia* spp. were used (kindly donated by Dr. GH Frank and Dr. B. Briggs, NADC, USDA). Agglutinations with titres above 1:64 were considered positive. Each plate included a positive and a negative control.

### 2.6. Identification of factors associated to *Mannheimia* spp. prevalence

A questionnaire was designed and applied at each of the sampled DF ( $n = 37$ ), with the purpose of identifying some variables probably associated to the epidemiology of manheimiosis, among which were included: animal age, calf accommodations, vaccines applied to prevent diseases of the respiratory tract (infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine syncytial virus and manheimiosis), to determine the degree of association with *Mannheimia* spp. prevalence.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was done with the Epi Info<sup>®</sup>, Version 3.3.2 program (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 2004). Data were used to calculate prevalence rates. In addition, the  $X^2$  or Fisher tests were applied depending on the data characteristics to evaluate associations, and OR were calculated to determine the degree of association. A logistic regression analysis was applied to evaluate the joined effect of the variables, in which the dependent variable was isolation or no isolation of *Mannheimia* spp. Only variables with a  $\leq 0.1$  probability of error obtained by univariate analysis with Chi square were selected, and those with  $P \leq 0.05$  remained in the model, a condition observed only for *M. haemolytica*.

### 3. Results

#### 3.1. Strain isolation and typification

All isolates ( $n = 187$ ) were Gram-negative, haemolytic, non-mobile coccobacilli, positive to cytochrome-oxidase production and to nitrate and nitrite reduction, and negative to the following tests: arginine dehydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, sulfhydrylic acid, tryptophan deaminase, urease, indole and gelatinase production, trehalose, L-rhamnose, D-melibiose, L-arabinose fermentation and McConkey agar growth.

Variations were found in the following percentages of isolates positive to some tests: galactosidase 97.9%, Voges Proskauer 30.5%, D-glucose fermentation 99.5%, D-mannitol 98.4%, inositol 23.5%, D-sorbitol 15%, D-sacarose 99.5%, amygdaline 3.2%. Six (3.2%) isolates were positive for amygdaline and aesculine (Table 2).

According to the threshold values established by the API 20E system, of the 187 analysed strains, 181 (96.8%) showed a %ID above 90%, and thus corresponded to *M. haemolytica*, and 6 (3.2%) showed a %ID lower than 80%, corresponding to a UP.

#### 3.2 Serotyping

Of the 187 isolates, 49 strains (26.2%) were serotype A1, 9 (5%) were serotype A6, 6 (3.2%) were serotype A11 and 123 strains (66%) were non-typable (NT). All strains identified as A1, A6 and NT showed phenotypic properties with %ID above 90%. On the other hand, phenotypical properties of all A11 strains corresponded to UPs, being positive to aesculine, amygdaline and sorbitol tests, which are features that correspond to *M. glucosida* strains according to other authors (Angen et al., 1999a; Angen et al., 2002).

In the CH animals, 24% were A1; 4.8%, A6; 2.4%, A11, and 69%, NT; in CA animals, 30% were A1; 4.8, A11; and 60%, NT (Figure 1).

### 3.3 Isolate prevalence rates

In CH bovines ( $n = 680$ ), 125 (18.5%) isolates were obtained, of which 122 (18%) (IC<sub>95%</sub> 21% to 15%) corresponded to the apparent prevalence rate (APR) of *M. haemolytica*, and 3 (0.4%) (IC<sub>95%</sub> 0% to 0.9%) to the APR of *M. glucosida*. In CA bovines ( $n = 194$ ), 62 (32%) isolates were obtained, of which 59 (30.4%) (IC<sub>95%</sub> 24% to 37%) corresponded to the APR of *M. haemolytica*, and 3 (1.5%) (IC<sub>95%</sub> 0% to 3.2%) to the APR of *M. glucosida*. In all cases, APR was among the IC<sub>95%</sub> values.

### 3.4. Associated factors

Among the associated factors, statistical significance in the frequency of *M. haemolytica* isolations was only found in relation with health conditions, age group in CH animals, and vaccination against mannheimiosis (Table 3). *M. haemolytica* isolation frequency was higher in: a) CA bovines than in CH bovines (OR= 1.94 [1.33 - 2.83]) ( $p < 0.05$ ); b) bovines younger than one year of age than in older animals, in CH bovines (OR= 23.98 [7.27 - 95.56]) ( $p < 0.05$ ); and c) in bovines not vaccinated against BPP than in vaccinated animals (OR= 1.52 [1.01 - 2.3]) ( $p < 0.05$ ). The variables of age, health condition and vaccination were included in the logistic regression analysis, and only age remained in the model (Table 4).

## 4. Discussion

Reproducibility of the phenotypic characterisation methods of *Mannheimia* is high however, serotyping by IHA alone is not sufficiently specific for reliable identification of *M. haemolytica*, if not supported by several biochemical tests, since the genus *Mannheimia* includes phenotypically and genotypically very heterogeneous taxa (Angen et al., 1999b; Angen et al., 2002).



In the present study, the frequency of NT strains, both in CH (69%) and in CA (60%) animals is higher than the frequencies found by other authors. Frequencies of NT strain isolates are very variable and can sometimes be high (Fraser et al., 1982b), and differ depending on the source of isolation: in Great Britain, Wray and Thompson have reported 9.3% in nasal swabs and 12.8% in pneumonic lungs in calves, and Quirie et al., (1986) reported 16.2% in pneumonic lung, 20.1% in nasal swab, 29.4% in blood, 25% in liver/spleen, 72.2% in female genital tract, 89.5% in udder and milk, 66.7% in intestinal tract and 16.6% in brain from cattle.

These NT strains normally correspond to the A biotype (Frank, 1980) and have been described as *M. haemolytica* mutants, some of which are deficient in soluble antigen production (Gentry et al., 1988).

The highest prevalence of serotype A1 among serotypable strains in the CH (24%) and CA (30%) bovine groups agrees with reports from other authors, who describe this serotype as the most frequent in bovines (Wray and Thompson, 1971; Rowe et al., 2001). Frequencies were lower than the 50% in nasal exudates of healthy calves reported by Wray and Thompson (1971) in Great Britain. It has additionally been shown that the A1 serotype predominates in calves transported to auction barns and feed-yards (Frank and Smith 1983). Tracheobronchial lavage studies have also report serotype A1 as the most frequent in bovines (Rowe et al., 2001).

It has been stated that isolate frequency is low in nasal cotton swabs of healthy, non-stressed animals, and high in calves with respiratory tract disease (Frank and Smith, 1983). This agrees with the prevalence values found in this study, which were higher for CA animals.

The present is the first isolation of the A6 serotype and *M. glucosida* from bovine nasal exudates in Mexico, since A6 has only been reported in ovine (Blanco et al., 1993) and

bovine lungs (Blanco-Viera et al., 1995), and *M. glucosida* in ovine exudates (Argueta et al., 1988). In other countries, serotype A6 has been reported in bovine lungs in the United States (Al-Ghamdi, 2000). Most of *M. glucosida* strains have been isolated from ovines (Wray and Thompson, 1971, Angen et al., 1999a, Angen et al., 2002, Sisay and Zerihun, 2003,) although some strains have also been isolated from cattle (Quirie et al., 1986).

Information on frequency, prevalence and incidence is scarce and unclear in Mexican studies. In calves, incidence ranges from 19.7 to 39.9%, or frequency from 29 to 49% for *P. haemolytica* in sera (Sánchez et al., 1988), and 25 to 32% in calf lungs (Blanco-Viera et al., 1995; Pijoan et al., 1999). These studies were performed with intentional samples mostly obtained at diagnostic centres, slaughterhouses, and to a lesser degree at livestock units. They are not sufficiently representative of reference populations, neither in quality nor in quantity, so that rates do not allow valid inferences concerning these populations.

In the present study, random sampling of the reference population and the isolate frequencies obtained constitute the APR, which allowed to infer, with a 95% confidence index, the actual prevalence rates (RPR). In CH bovines, RPR values for *M. haemolytica* range from 15 to 20% and for *M. glucosida* from 0 to 0.9%; and in CA bovines, values for *M. haemolytica* range from 23.9 to 36.8% and for *M. glucosida* from 0 to 3.2%.

The present results are only partially comparable with other national and international studies, since the samples used in other studies are different in origin and characteristics. In CH bovines, the *M. haemolytica* APR (18%) obtained was similar to that found in calf nasal exudates by Frank and Smith (1983) (17%), and lower than that reported by Wray and Thompson (1971) (88%). In CA bovines, *M. haemolytica* APR (30.4%) was higher than the frequency of 25% reported by Zanabria et al. (2000) in bovine nasal exudates.

The *M. glucosida* APR in CH (0.4%) and in CA bovines (1.5%) were lower than the frequencies reported by Wray and Thompson (1971) in nasal exudates of healthy calves (2.5%).

No previous studies have been published in Mexico concerning the evaluation of *M. haemolytica* and its distribution pattern with respect to predisposing factors such as age, health conditions or other determining factors. Most studies, national and international, concentrate on the clinical aspects and pathogenicity of the *Mannheimia* genus.

The higher frequency of *M. haemolytica* isolates in CA than in CH bovines (OR= 1.94 [1.33-2.83]), and in CH bovines under one year of age than in older animals, (OR= 23.98 [7.27-95.56]), confirms that isolates of the genus *Mannheimia* are more frequent in young, especially under one year of age, and diseased animals, because they are consistently the most susceptible groups. This also agrees with statements by other authors (Wray and Thompson, 1971; Pijoan et al, 1999).

Differences in *M. haemolytica* and *M. glucosida* isolation frequency according to the type of calf accommodations were in no case significant. There are doubtlessly other confounding factors that intervene, such as: management, hygiene, colostrum quality and supply, and weather conditions, which should be evaluated in more detail. The influence of the type of accommodations in the presence of pneumonia is controversial (Pijoan and Chávez, 2003). It has been reported that there are no significant differences if calves are indoors or outdoors regarding health (Jorgenson et al., 1970), and no association between health and cage dimensions or materials were found (Fisher et al., 1985). All other analysed variables showed no significant differences or consistency to allow comparisons or solid conclusions.

These results allow us to conclude that the isolates obtained in this study, together with those of another study we are presently performing in a different region of Mexico

(unpublished results), constitute the most representative collection of *Mannheimia* strains of bovine origin in the country. Most isolates were NT, followed by the A1 serotype as the most frequent; confirming other reports (Frank, 1982; Quirie et al., 1986). According to the APR, bovines younger than one year of age and those with disease were the groups with the highest frequency of *M. haemolytica* and *M. glucosida* isolates. Isolation of the latter is the first to be recorded in bovine nasal exudate in Mexico.

Further studies are underway with molecular biology techniques for definitive identification of the isolated strains.

### **Acknowledgement**

CJ Jaramillo-Arango received scholarship No. 180224 from CONACyT (Mexican National Council for Science and Technology). This study was financed by CONACyT (Project G38590-B). We would like to thank the livestock breeders of the dairy farms in the State of Hidalgo, Mexico, and Ingrid Mascher for her valuable suggestions and comments in the present manuscript.

### **References**

- Al-Ghamdi, G.M., Ames, T.R., Baker, J.C., Walker, R., Chase, C.C., Frank, G.H., Maheswaran, S.K., 2000. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest* 12(6): 576-8.
- Angen, O., Mutters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1999a. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16SrRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen., comb.nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 49: 67-86.
- Angen, O., Quirie, M., Donachie, W., Bisgaard, M., 1999b. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol* 65: 283-290.
- Angen, O., Ahrens, P., Bisgaard, M., 2002. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microb* 84: 103-114.
- Argueta, G.J., Mercado, P.M., Trigo, T.F.J., 1988. Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. *Vet Méx*; 19: 93-97.
- Blanco, V.F.J., Trigo, T.F.J., Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Tapia, P.G., Suarez, G.F., 1993. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a

- partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet Méx* 24(2): 107-112.
- Blanco-Viera, F.J., Trigo, F.J., Jaramillo-Meza, L., Aguilar-Romero, F., 1995. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Rev Lat-Amer Microbiol* 37: 121-126.
- Biberstein, E.L., 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Berges and Norris JR. *Methods in Microbiology*. Acad Press Inc. N.Y.10: 253-269.
- Colín, F.R., Jaramillo, L., Aguilar, F., Trigo, F.J., Merino, M.M., 1987. Serotipos de *Pasteurella hemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev Lat-Amer Microbiol* 29: 231-234.
- Frank, G.H., 1980. Serological groups among untypable bovine isolates of *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol* 12: 579-582.
- Frank, G.H., 1982. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the Midwestern United States. *Am J Vet Res* 43(11): 2035-2037.
- Frank, G.H., Smith, P.C., 1983. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am J Vet Res* 44 (6): 981-985.
- Fraser, J., Gilmour, N.J.L., Laird, W.S., 1982a. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* serotypes isolated from ovine pasteurellosis in Britain. *Vet Rec* 110: 560-561.
- Fraser, J., Laird, S., Gilmour, N.J.L., 1982b. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci* 32: 127-128.
- Fisher, L.J., Peterson, G.B., Jones, S.E., Shelford, J.A., 1985. Two housing systems for calves. *J Dairy Sci* 68: 368-373.
- Gentry, M.J., Confer, A.W., Holland, S.G., 1988. Comparison of the toxic and antigenic properties of single bovine isolates of *Pasteurella haemolytica* representing five serotypes and an untypable strain. *Vet Microbiol* 16: 351-367.
- Jorgenson, L.J., Jorgensen, N.A., Schingoethe, D.J., Owens, M.J., 1970. Indoor versus outdoor calf rearing at three weaning ages. *J Dairy Sci* 53 (6): 813-817.
- Murphy, G.L., Robinson, L.C., Burrows, G.E., 1993. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *Clin Microbiol* 31 (9): 2303-2308.
- Narayanan, S.K., Nagaraja, T.G., Chengappa, M.M., Stewart, G.C., 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 84: 337-356.
- Pijoan, P., Aguilar, R.F., Morales, A.F., 1999. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet Méx* 30(2): 149-155.
- Pijoan, A.P., Chávez, D.J.A., 2003. Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet Méx* 34(4): 333-342.
- Quirie, M., Donachie, W., Gilmour, N.J.L., 1986. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet Rec* 119, 93-94.
- Rowe, H.A., Poxton, I.R., Donachie, W., 2001. Survival of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Vet Microbiol* 81: 305-314.
- Sánchez, M.P.H., Morales, A.J.F., Zepeda, M. de O., Espino, R.G., Trigo, T.F.J., 1988. Determinación de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *Pasteurella haemolytica* en suero de bovinos y caprinos. *Téc Pec Méx* 26(2): 192-202.
- Segura, J.C., Honhold, N., 2002. Métodos de muestreo para la producción y la salud animal. México: Universidad Autónoma de Yucatán: 75-100.

- Sisay, T., Zerihun, A., 2003. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the Highlands of Wollo, North East Ethiopia. *Vet Res Communic* 27(1): 3-14.
- Trigo, T.F.J., 1991. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Vet Méx XXII*(2): 131-134.
- Wray, B.C., Thompson, D.A., 1971. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. *Br Vet* 127: lxvi-lxvii.
- Zanabria, V., Rivera, G.H., Rosadio, A.R., 2000. Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. *Rev Inv Vet Perú* 11(12): 169-187.

Table 1.

Phenotypic reactions characterising the different species in the *Mannheimia* genus.\*

Test	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. glucosida</i>	<i>M. varigena</i>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M. ruminalis</i>
Mannitol	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+/-
D-Xilose	+	+	+	+/-	+/-
D-Sorbitol	+	+	-	+	+/-
$\alpha$ -fucosidase (ONPF)	+	+	+/-	-	-
Haemolysis	+	+	+	-	-
$\beta$ -galactosidase (ONPG)	+/-	+	+/-	+/-	+
$\beta$ -glucosidase (NPG)	-	+	+/-	+	-
Glycosides <sup>a</sup>	-	+	-	+/-	-
L-Arabinose	-	+/-	+	-	-
Ornithine decarboxylase	-	+/-	+/-	-	-
Indole	-	-	+/-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-

\* Angen et al., 1999a; Angen et al., 2002.

+: positive ; -: negative; +/-: positive or negative

<sup>a</sup> Amygdalin, aesculin, arbutin, cellobiose, gentobiose, and salicin.

Table 2.  
Phenotypic characteristics of *Mannheimia spp* strains isolated  
in bovines from dairy farms in the Central Valley of Mexico.

Phenotypic characteristics	Positive %
Haemolysis	100
Cytochrome oxidase	100
Nitrate reduction	100
D-glucose	99.5
D-sucrose	99.5
D-mannitol	98.4
$\beta$ -galactosidase (ONPG)	97.9
Inositol	23.5
D-sorbitol	15
Amygdalin <sup>a</sup>	3.2
Aesculin <sup>a</sup>	3.2
Motility	0
Voges Proskauer	0
MacConkey medium growth	0
Gelatinase	0
Lysine decarboxylase	0
Arginine dehydrolase	0
Ornithine decarboxylase (ODC)	0
Citrate	0
Indole	0
H <sub>2</sub> S	0
Urease	0
Tryptophane deaminase	0
Trehalose	0
L-rhamnose	0
D-melobiose	0
L-arabinose	0

<sup>a</sup> Six isolates were positive to these characteristics  
and corresponded to serotype A11 (*M. glucosida*).



Table 3.

Factors associated with *M. haemolytica* and *M. glucosida* isolates in bovines from dairy farms in the Central Valley of Mexico.

Associated factors	<i>M. haemolytica</i>		<i>M. glucosida</i>	
	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
Diseased vs. healthy	1.9 (1.3 – 2.8)	< 0.001	3.5 (0.5 -22.1)	0.100
Age under 1 vs. over 1 (healthy)	23.9 (7.2 – 95.5)	< 0.001	Undefined	0.325
Age under 1 vs. over 1 (diseased)	3.6 (0.4 – 79.6)	0.182	Undefined	0.866
Indoors vs. outdoors	1.5 (0.6 – 3.5)	0.242	Undefined	0.062
Group vs. individual	1.2 (0.8 – 1.8)	0.201	Undefined	0.066
Vaccinated No vs. Yes	1.5 (1.0 – 2.3)	0.032	2.1 (0.2 – 13.8)	0.317

OR, Odds ratio and confidence interval 95%; p, significant difference ( $p \leq 0.05$ ) or not significant ( $p > 0.05$ ) to Chi square or Fisher tests.

Table 4.

Logistic regression model for *M. haemolytica* isolation in bovines from dairy farms in the Central Valley of Mexico.

Risk factor	$\alpha$	$\beta$	OR	CI 95%	P
Age <sup>a</sup>	- 3.90	2.91	18.40	6.70 - 50.49	< 0.01
Health conditions <sup>b</sup>			1.35	0.92 - 1.97	0.12
Vaccination <sup>c</sup>			0.88	0.58- 1.33	0.57

<sup>a</sup> Age under 1 vs. over 1 (healthy).

<sup>b</sup> Diseased vs. healthy.

<sup>c</sup> Vaccinated no vs. yes.

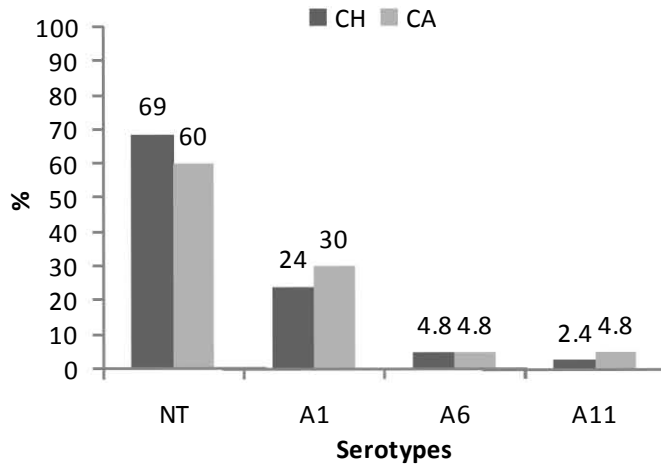


Figure 1. Serotypes of *Mannheimia spp* strains isolated in CH and CA bovines from dairy farms in the Central Valley of México

## CAPÍTULO V

### **Characterisation of *Mannheimia* spp. and *P. multocida* strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico.**

C.J. Jaramillo-Arango, R. Hernández-Castro, V. Campuzano-Ocampo, F. Suárez-Güemes, R. Delgado-González, F. Trigo-Tavera.

# CHARACTERISATION OF *Mannheimia* spp. and *P. multocida* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE PNEUMONIC LUNGS IN TWO SLAUGHTERHOUSES IN MEXICO.

<sup>1\*</sup>C.J. Jaramillo-Arango; <sup>2</sup>R. Hernández-Castro; V. <sup>1</sup>Campuzano-Ocampo; <sup>1</sup>F. Suárez-Güemes; <sup>3</sup>R. Delgado-González; <sup>1</sup>F. Trigo-Tavera.

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, México.

<sup>2</sup> Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Dirección de Investigación, Secretaría de Salud, México, D.F., 14080, México.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Unidad Laguna, Torreón, Coahuila, México.

---

**Abstract:** *Mannheimia* spp and *P. multocida* (Pm) strains were isolated from pneumonic lungs (n=475) which were obtained in two slaughterhouses in Mexico. Isolation and phenotyping were carried out by means of *in vitro* culture, as well as biochemical and immunological tests. Of the 131 isolates 60.3% was Pm and 39.7% was *Mannheimia* spp. The isolating rate in lungs was 16.6% for Pm, 10.7% *M. haemolytica* (Mh) and 0.2% *M. glucosida* (Mg) in both slaughterhouses. These differences were significant ( $p \leq 0.05$ ). Out of 52 *Mannheimia* spp. isolations, 98% was Mh and 1.9% Mg. Out of 51 Mh isolates 33% was of serotype 1(S1), 17.6% S6 and 49% non-typable (NT). These differences were significant ( $p \leq 0.05$ ). Out of 79 Pm isolations, 98.7% was biotype A and 1.2% biotype D. These differences were significant ( $p \leq 0.05$ ). Pm got the highest rate of isolations in lungs which differs from data of previous results where Mh is considered as the most pathogenic bacteria and the most commonly associated to bovine pasteurellosis pneumonic. The highest frequency of Mh S1 and Pm biotype A confirms that these two bacteria are the most commonly found in pneumonic lungs in Mexico.

**Key words:** *Mannheimia* serotypes, *P. multocida* biotypes, pneumonic lung, Cattle

---

## INTRODUCTION

Among the infectious diseases that affect bovine, the respiratory ones are the main cause of loss worldwide, specially among young animals (Lekeu, 1996). Pneumonia is responsible for approximately 75% of clinical cases and is directly involved between 45 to 55% of mortality; medical treatment represents 8% of the total cost of production (Zecchinon *et al*, 2005). *Pasteurellaceae* microorganisms are opportunistic and primary

---

\* Corresponding Author: C.J. Jaramillo-Arango, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad

Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, México.  
E-mail address: cjja@servidor.uanm.mx

pathogens as well as hosts of the upper respiratory tract of domestic and wild animals (Chaslus-Dancla *et al.*, 1996). *P. haemolytica* and *P. multocida* may cause primary diseases, such as pneumonias or haemorrhagic septicemia, as well as secondary infections. Furthermore, they are considered as one of the main causes of pneumonia in ruminants all around the world (Blanco-Viera *et al.*, 1995; Chaslus-Dancla *et al.*, 1996). *P. multocida* subsp. *multocida* is the most widely studied among the *Pasteurella* genus; there are five capsular groups (A, B, D, E and F) as well as 16 somatic serotypes. (Carter GR, 1967; Boyce *et al.*, 2004; Sleim, 2005). Several diseases are frequently associated with some of these groups; the hemorrhagic septicemia is regularly associated with B and E groups; the respiratory tract infections with group A; fowl cholera with A, F and rarely D groups; pig's atrophic rhinitis and bovine pneumonia with group D (Boyce *et al.*, 2004, García *et al.*, 1988).

*Pasteurella haemolytica* complex negative to trehalose was reclassified as the new *Mannheimia* genus which includes at least five species: *M. haemolytica*, *M. granulomatis*, *M. glucosida*, *M. ruminalis* and *M. varigena*; as well as all serotypes of *P. haemolytica* biotype A (1, 2, 5-9, 12-14, 16 and 17) were reclassified as *M. haemolytica* (Mh). Serotype 11 was reclassified as the new *M. glucosida* species (Mg) (Angen *et al.*, 1999a, Angen *et al.*, 1999b, Highlander, 2001, Zecchinon *et al.*, 2005).

Mh is found in the nasopharynx and tonsils of apparently healthy animals (Rowe *et al.*, 2001; Narayanan *et al.*, 2002) and it is also the most pathogenic and main microorganism responsible for the bovine pneumonic pasteurellosis or shipping fever (Trigo, 1991; Murphi *et al.*, 1993; Pijoan *et al.*, 1999; Narayanan *et al.*, 2002). The S1 and S2 are the most prevalent in the world and the ones that are most frequently isolated from calves (Wray and Thompson, 1971).

Since the 80's, it has been demonstrated in Mexico that the most significant *M. haemolytica* serotypes in ruminants are the 1 and 2 in bovine and 1, 2, 5 and 9 in ovine according to their pulmonary frequency (Pijoan *et al.*, 1999, Blanco-Viera *et al.*, 1995, Colin *et al.*, 1987, Blanco *et al.*, 1993); and within *P. multocida* only the A and D capsular serotypes in ovine and caprine have been isolated (Blanco *et al.*, 1993, Blanco-Viera *et al.*, 1995) and the A in bovine (Blanco-Viera *et al.*, 1995, Pijoan *et al.*, 1999, Jaramillo *et al.*, 1987). Most of the research work carried out in the country on ruminants' pneumonia has been on ovine and the available data on bovine is limited.

The aim of this work was to isolate and characterize the strains of *Mannheimia* spp and *P. multocida* (Pm) genus of pneumonic lungs in sacrificed bovine in two slaughterhouses in two different geographical areas in Mexico to determine the differences among the frequencies of the different isolated serotypes and biotypes.

## **MATERIAL AND METHODS**

**Characterization of the studied area and sampling design:** We carried out a descriptive, transversal and prospective study by means of nonprobability sampling in two slaughterhouses; one located in Tlalnepantla (STL) in the state of Mexico and the other in Gómez Palacio in the state of Durango (SGP). We examined a total of 475 pneumonic lungs over a six month-period (STL, n=362; SGP, n=113).

**Sample collecting:** Out of the total number of examined lungs, we collected samples of the tissue infected by pneumonia, which is clearly identified by the presence of consolidation areas, blood-red aspect, and, occasionally, the presence of adherences and fibrin thrombus. Samples were packed in sterile bags and kept in the refrigerator or the freezer up to their processing time in the bacteriology lab at the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-Microbiología), of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

**Strain isolation and identification:** The lung tissue samples were grown on blood agar by contact with the addition of 5% of sheep blood (BBL, Becton Dickinson); they were incubated at 37°C for 24 h. Phenotype identification of colonies with the typical *Mannheimia* spp or Pm shape was carried out by conventional means: Gram staining and biochemical tests (oxidase, carbohydrate fermentation and sulfhydrylic acid production (TSI), citrate utilization, motility, indole production, urease production, trehalose and aesculine fermentation). A single representative colony was chosen for evaluation. Colonies were grown again in blood agar (5% sheep blood) (37°C/24h) and pure cultures of the strain were obtained.

Final identification was performed with the API 20E bacterial identification system (bioMerieux, Inc.). Briefly, cultures were resuspended in 5 mL of sterile suspension medium at a density of 4.0 in the McFarland scale. The suspension was transferred to strips for biochemical tests and the reading of the reactions was carried out after incubation at 37°C for 24 h, in agreement with the system's instructions. All biochemical tests were also applied to reference strains of Mh (1, 2, 5-9, 11 and 12), Pm (A and D) and *P. trehalosi* (S3, S4 and S10).

The profile results of each strain were compared to those of the taxons of a data base in the APIWEB Program (<http://www.biomerieux.com>). Moreover, we considered the phenotypical properties of *Mannheimia* spp mentioned by other authors (Angen *et al.*, 1999a, Angen *et al.*, 2002).

**Serologic typification of *Mannheimia* spp strains:** We performed it by the IHA described by Biberstein (1978); we used monospecific antisera against capsular antigens (1-17) of *Mannheimia* spp. Agglutinations with titres over 1:64 were positive. In each plate we included a positive and a negative control.



**Typification of Pm strains:** We performed it by means of hyaluronidase decapsulation test (Carter and Rundell, 1975) for biotype A and by acriflavine test (Carter and Subronto, 1973) for biotype D; we used reference biotypes A and D strains.

All reference strains of Mh, Pm and *P. trehalosi* as well as the monospecific antisera of *Mannheimia* spp were kindly donated by Dr. G.H. Frank and Dr. B. Briggs, NADC, USDA.

**Statistical analysis:** Statistical analysis was carried out with the Epi Info<sup>®</sup> program, Version 3.3.2 for Windows (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, USA, 2004). We figured out the isolation frequencies with the data gathered of the different serotypes and biotypes in each of the studied slaughterhouses. We used the square Chi or Fisher test, according to the characteristics of the data in order to evaluate the differences among the isolation frequencies of the serotypes of the *Mannheimia* spp genus and that of the Pm biotypes.

## RESULTS

### Strains phenotyping

***Mannheimia* spp.:** All isolates of the STL (n= 37) and the SGP(n= 15) were Gram-negative, haemolytic, non-mobile coccobacilli, positive to cytochrome-oxidase and  $\beta$ -galactosidase production, to nitrate and nitrite reduction, to D-mannitol, D-glucose and D-saccharose fermentation, and negative for the following tests: Voges Proskauer, gelatinase, arginine-dehydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, sulfhydic acid, urease, and indole production, trehalose, D-sorbitol, L-arabinose, amygdaline and aesculine fermentation and McConkey agar growth.

One isolate of SGP (6.6%) was positive for amygdaline and aesculine and corresponded to *M. glucosida* (Mg) (Table 1).

In accordance with the API 20 E system and the phenotyping properties of the *Mannheimia* spp (Angen *et al.*, 1999a, Angen *et al.*, 2002), 97.3% (36/37) of the STL strains and 86.6% (13/15) of the SGP corresponded to Mh; and, 2.7% (1/37) of STL and 13.3% (2/15) of SGP to the *Mannheimia* spp.

***P. multocida*:** All STL (n=62) and SGP (n=17) isolates were Gram-negative, haemolytic, non-mobile coccobacilli, positive to cytochrome-oxidase and  $\beta$ -galactosidase production, to nitrate and nitrite reduction, to D-mannitol, D-glucose, D-saccharose and trehalose fermentation, to indole production and ornithine decarboxylase test, and negative to the following tests: Voges Proskauer, gelatinase, arginine-dehydrolase, lysine decarboxylase, citrate utilization, sulfhydryric acid and urease production, D-sorbitol, L-arabinose, amygdaline and aesculine fermentation, and McConkey agar growth. (Table 1).

Out of the 131 *Mannhemia* spp and Pm isolates in both slaughterhouses, 60.3% (79/131) were Pm, 39.6% (52/131) Mh, and 0.76% (1/131) Mg. In the STL 99 isolates were obtained, of which 62.6% were Pm and 37.3% were *Mannheimia* spp. In the SGP 32 isolates were obtained, of which 53.1% were Pm, 43.7% were Mh, and 3.1% were Mg. All these differences were significant ( $p \leq 0.05$ ), but not when compared between the differences of both slaughterhouses (Table 2).

**Isolate rate in lungs:** Out of 475 pneumonic lungs (PL) examined in the STL and the SGP, 16.6% (79/475) of the isolates were Pm, 10.7% (51/475) were Mh, and, 0.2% (1/475) was Mg. In 362 PL of the STL, 17% (62/362) of the isolates were Pm and 10.2% (37/362) was Mh; these differences were significant ( $p \leq 0.05$ ). In 113 PL of the SGP, 15% (17/113) of the isolates were Pm; 12.4% (14/113) was Mh; and 0.8% (1/113)

was Mg. These differences were only significant ( $p \leq 0.05$ ) for the Mg rate in regards to the Mh and Pm rates (Table 3).

### **Strain serotyping**

***Mannheimia* spp.:** Out of the 52 *Mannheimia* spp isolates in both slaughterhouses, 98% (51/52) corresponded to Mh, and, 1.9% (1/52) to Mg. Out of the Mh isolates, 33% (17/51) was serotype 1 (S1), 17.6% (9/51) S6; and, 49% (25/51) NT. These differences were significant ( $p \leq 0.05$ ) (Table 2).

All STL isolates (37) were Mh, out of which 35% (13/37) were S1, 24.3% (9/37) S6, and, 40.5% (15/37) NT.

Out of the 15 *Mannheimia* spp isolates of SGP, 93% (14/15) were Mh, and 6.7% (1/15) were Mg. Out of the Mh isolates, 28.5% (4/14) were S1 and 71.4% (10/14) NT. The differences among the isolate frequencies of the different Mh serotypes were significant ( $p \leq 0.5$ ) for SGP, but not for STL (Table 3, Figure 1).

***P. multocida*:** Out of 79 Pm isolates, 98.7% (78/79) corresponded to A biotype and 1.2% (1/79) to D biotype in both slaughterhouses. These differences were significant ( $p \leq 0.5$ ) (Table 2).

A hundred percent of STL isolates were A biotype; 94% in the SGP (16/17) were A biotype; and 5.9% (1/17) D biotype. These differences were significant ( $p \leq 0.5$ ). (Table 2, Figure 1).

## **DISCUSSION**

The results of this work show that higher rates of isolates in lungs were of Pm in general level (79%) as well as in each of the traces (STL= 17%; SGP= 15%); we would like to emphasize that these differences were significant. These data is similar to that found in previous studies made on bovine lung samples from necropsies or in slaughterhouses, in which *Pasteurella* spp isolates have been obtained. Pm has been the main isolate

microorganism with rates from 32 to 62% (Blanco-Viera, *et al.*, 1995, Pijoan *et al.*, 1999), whereas in other studies Mh is reported as the most frequent isolate in lamb pneumonic lungs; Jaramillo *et al.* (1987) found frequencies of 22% for Mh and 19.6% for Pm in Mexico; likewise, in lamb necropsies with pneumonia they reported 55.5% for Mh and 44.5% for Pm in England (Allan *et al.*, 1985); 42% for Mh and 8% for Pm in Turkey (Hazirolu *et al.*, 199); and, 46.3% for Mh and 34.7% for Pm (Welsh *et al.*, 2004). Throughout a nine-year-study on isolates found in pneumonic lung samples carried out in a diagnosis lab, they could verify that isolate frequencies varied from 30.6 to 64.1% for Mh and from 20 to 47.4% for Pm (Welsh *et al.*, 2004).

Even though some authors describe Pm as the most commonly isolate bacteria in lambs (Virtala *et al.*, 1996; Welsh *et al.*, 2004), it is generally believed that Mh is the most pathogenic bacteria and the most regularly associated with the respiratory diseases complex of bovines, mainly with the mannheimiosis (Trigo, 1991; Murphi *et al.*, 1993; Pijoan *et al.*, 1999).

Previous studies agree that the reproduction of the phenotyping characterization methods of *Mannheimia* spp is high; however, the serotypification through IHA is not specific enough for a Mh reliable identification as long as it is not supported by a wide batch of biochemical tests, since the genus *Mannheimia* includes phenotypically and genotypically very heterogeneous taxa (Angen *et al.*, 1999b; Angen *et al.*, 2002).

The highest S1 isolate frequency among the Mh serotypable strains coincides with the findings in other studies that consider this serotype as the most frequent in bovine pneumonic lungs in Mexico (Jaramillo *et al.*, 1987; Blanco-Viera, *et al.*, 1995; Pijoan *et al.*, 1999) as well as in North America and Europe (Al-Ghamdi *et al.*, 2000; Wray and Thompson, 1971; Quirie *et al.*, 1986). These frequencies are fewer than those reported in several studies showing frequencies from 58 to 88.9% in Mexico (Jaramillo *et al.*, 1987;

Blanco-Viera *et al.*, 1995; Pijoan *et al.*, 1999); or 59 to 63% in the U.S. (Al-Ghamdi *et al.*, 2000), or in England (Quirie *et al.*, 1986; Wray and Thompson 1971); but higher than 10% reported by Purdy *et al.* (1997) in the United States.

It is widely known that even though other Mh serotypes such as 2, 6, 7, 8, 9 and 11 may be part of the regular flora of the upper respiratory tract of bovine, S1 may experience an explosive development and turn into the dominant isolate in the bovine nasopharynx under an stressful handling, viral infections or environmental changes, in such a way that after colonization of the Mh upper respiratory tract, S1 easily invades the lung through the inhalation of drops or infected tissue residues (Frank-Smith, 1983; Al-Ghamdi *et al.*, 2000).

Our findings supports that other serotypes different of S1 together with NT strains may be found in mannheimiosis lesions, as it is shown in other studies (Blanco-Viera *et al.*, 1995; Purdy *et al.*, 199; Pijoan *et al.*, 1999; Al-Ghamdi *et al.*, 2000); and that they may probably be able to produce the pathological changes found in pneumonic lungs (Purdy *et al.*, 1997). The S6 isolate frequency in both slaughterhouses coincides with the data reported by Blanco-Viera *et al.*, (1995) in Mexico, in spite of STL's superiority (24%). This serotype has also been isolated in bovine nasal exudate in previous studies (Jaramillo *et al.*, 2007a; Jaramillo *et al.*, 2007b). Mg isolate is the first achieved in Mexico in bovine pneumonic lungs as it has only been reported in nasal ovine nasal exudates (Wray and Thompson, 1971; Angen *et al.*, 1999a; Angen *et al.*, 2002; Sisay and Zerihun, 2003). Some strains have also been isolated in bovine (Quirie *et al.*, 1986), however, it is rarely isolated or associated with bovine diseases (Angen *et al.*, 1999a).

The range of serotypes found in this work coincides with that reported in several studies in Mexico and other countries (Quirie *et al.*, 1986; Jaramillo *et al.*, 1987; Wray and Thompson, 1971; Pijoan *et al.*, 1999), but it is lower that reported by others (Blanco-

Viera *et al.*, 1995; Al-Ghamdi *et al.*, 2000). It is not clearly stated whether the isolate of other serotypes different from S1 represent genetic changes in the capability of other serotypes to colonize and reproduce in the respiratory tract and therefore induce or not lesions (Al-Ghamdi *et al.*, 2000).

In this work, the frequencies of NT strains in both slaughterhouses (49%) and in each of them (STL, 40.5%; SGP, 71.4%) are higher than that found in other studies. These NT strain frequencies are varied and sometimes they may be high (Fraser *et al.*, 1982) and they may diverge according to the source of isolation. The frequencies of pneumonic lungs reported in Mexico vary from 8% to not more than 18% (Jaramillo *et al.*, 1987; Blanco-Viera *et al.*, 1995; Pijoan *et al.*, 1999); and in other countries frequencies from 5 to 24% have been reported (Quirie *et al.*, 1986; Wray and Thompson, 1871; Al-Ghamdi *et al.*, 2000).

These NT strains generally correspond to the A biotype (Frank, 1980), and have been previously described as Mh mutants; some of which are deficient in the production of soluble antigens (Gentry *et al.*, 1988). Regarding this matter, we believe that perhaps the serotyping was not sensitive and specific enough to classify all strains. Some of the NT could possibly correspond to 1 or 2 serotype or any other Mh serotype. In regards to this, some studies cited by Frank (1980) mention the possibility that strains already classified as NT by IHA, may be, in fact, strains that belong to serotypes typified by IHA, but that the impossibility to react to IHA may be due to a loss of specific serotype antigens in the cell layer. This corroborates the difficulties that arise in the IHA test in Mh serotyping.

The highest Pm biotype A frequency found in this work coincides with the data reported by other national and foreign studies. Most of the studies carried out in pneumonic lungs in Mexico identify A biotype as the only isolate with 100% frequencies (Jaramillo

*et al.*, 1987; García *et al.*, 1988; Pijoan *et al.*, 1999), which agrees with the STL isolates. Other studies report lower frequencies regardless of the A biotype dominance; Madsen *et al.* (1983) report 81%, Blanco-Viera *et al.* (1995) 61%, and De Rosa *et al.* (2000) 3 out of 4 isolates (75%).

The D biotype finding in the SGP, despite its lower frequency (5.9%), coincides with the findings by Blanco-Viera *et al.* (1995) who report 25%.

These results verify the Pm A biotype dominance, which is considered to be associated with bovine pneumonic problems, while the D biotype is more associated to occasional infections (Jaramillo *et al.*, 1987; Pijoan *et al.*, 1999). These data lead to the belief that this is an indicator that A biotype is the one that most frequently affects bovines in Mexico.

With the data gathered here we can conclude that the highest rate of isolates in lungs, in both and each of the slaughterhouses studied corresponded to Pm. This coincides with some studies but differs from others that consider Mh as the most pathogenic bacteria and the one most frequently associated to bovine pneumonic pasteurellosis. Moreover, the highest Mh frequency of S1 and the Pm A biotype verify that these two bacteria are the most frequently found in pneumonic lungs in Mexico. Furthermore, Mg isolation is the first achieved in bovine pneumonic lungs in Mexico, and the Mh isolation of NT strains is higher than that reported in other studies in Mexico or abroad. All isolates are being characterized with techniques of molecular biology to differentiate the genotypes.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

C.J. Jaramillo-Arango received Scholarship No. 180224 from CONACyT (Mexican National Council for Science and Technology). This study was financed by CONACyT (Project G38590-B). We thank the slaughterhouses in Tlalnepantla and in Gomez Palacio municipalities, Dr. G.H. Frank and Dr. B. Briggs for providing the strains and

monospecific antisera against capsular antigens of *M. haemolytica*, *P. trehalosi* and *P. multocida*, and Josefina Volado, for her valuable suggestions and comments in the present manuscript.

## REFERENCES

Al-Ghamdi GM, Ames TR, Baker JC, Walker R, Chase CC, Frank GH, Maheswaran SK. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12(6): 576-8.

Allan EM, Wiseman A, Gibbs HA, Selman IE. *Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns. *Vet Rec* 1985; 117 (24), 629-631.

Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16SrRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen., comb.nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 1999a; 49: 67-86.

Angen O, Quirie M, Donachie W, Bisgaard M. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol* 1999b; 65: 283-290.

Angen O, Ahrens P, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microb* 2002; 84: 103-114.

Argueta, GJ, Mercado PM, Trigo TFJ: Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. *Vet Méx* 1988; 19: 93-97.

Blanco VFJ, Trigo TFJ, Jaramillo ML, Aguilar RF, Tapia PG, Suarez GF: Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet Méx* 1993; 24(2): 107-112.

Blanco-Viera FJ, Trigo FJ, Jaramillo-Meza L, Aguilar-Romero F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1995; 37: 121-126.

Biberstein EL. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Bergees and Norris JR. *Methods in Microbiology*. Acad. Press Inc. N.Y.10: 253-269, 1978.

Boyce JD, Lo RYC, Wilkie I, Adler B. *Pasteurella* and *Mannheimia*. In: Giles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. *Pathogenesis of Bacterial Infectious in Animals*. Carlton, Australia: Blackwell Publishing, 2004: 273-294.

Carter GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. *Adv Vet Sci* 1967: 321-379.



Carter GR, Rundell SW. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Vet Rec* 1975; 96:343.

Carter GR, Subronto P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavin. *Am J Vet Res* 1973; 34:293-294

Colín FR, Jaramillo L, Aguilar F, Trigo FJ, Merino MM. Serotipos de *Pasteurella hemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1987; 29: 231-234.

Chaslus-Dancla E, Lesage-Descauses MC, Leroy-Sétrin S, Martel JL, Courdet P, Lafont JP. Validation of random amplified polymorphic DNA assays for ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. *Vet Microbiol* 1996; 52: 91-102.

De Rosa DC, Mechor GD, Staats JJ, Chengappa MM, Shryock TR. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (1): 327-332.

Frank GH, Smith PC. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am J Vet Res* 1983; 44 (6): 981-985.

Fraser J, Laird S, Gilmour NJL. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci* 1982b; 32: 127-128.

García EH, Trigo TFJ, Sánchez-Mejorada PH, Aguilar RF. Serotipos de *Pasteurella multocida* en bovinos productores de carne en México. *Vet Méx* 1988; 19: 199-204.

Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia*. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6: 1128-1150.

Jaramillo ML, Aguilar RF, Trigo TFJ. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos en becerros en México. *Vet Méx* 1987; 18: 185-188.

Jaramillo-Arango CJ, Hernández-Castro R, Suárez-Güemes F, Martínez-Maya JJ, Aguilar-Romero F, Jaramillo-Meza L, Trigo FJ. Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico. *J Anim Vet Adv* 2007a; 6 (3): 404-409.

Jaramillo-Arango CJ, Hernández-Castro R, Suárez-Güemes F, Martínez-Maya JJ, Aguilar-Romero F, Jaramillo-Meza L, Trigo FJ. Characterisation of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudates and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. *Res Vet Sci* 2007b; (Article in press).

Lekeu P. Bovine respiratory disease complex. *Ann Med Vet* 1996; 140 (2): 101-105.

Madsen EB, Bisgaard M, Muttters R, Pedersen KB. Characterization of *Pasteurella* specie isolated from lung of calves with pneumonia. *Can J Comp Med* 1985; 49: 63-67.

Murphi GL, Robinson LC, Burrows GE. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. Clin Microbiol 1993; 31 (9): 2303-2308.

Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. Vet Microbiol 2002; 84: 337-356.

Pijoan P, Aguilar RF, Morales AF. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. Vet Méx 1999; 30(2): 149-155.

Quirie M, Donachie W, Gilmour NJL. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. Vet Rec 1986; 119, 93-94.

Purdy CW, Raleigh RH, Collins JK, Watts JL, Straus DC. Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. Curr Microbiol 1997; 34: 244-249.

Sisay T, Zerihun A. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the Highlands of Wollo, North East Ethiopia. Vet Res Communic 2003; 27(1): 3-14.

Sleim RS. Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. Bacteriology Department, Animal Health Research Institute, Nadi El Cairo, Egypt. Jan 2005 [14 screens]. Available from: URL: [http:// www.priory.com/vet/pasteurella.htm](http://www.priory.com/vet/pasteurella.htm).

Trigo TFJ: Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. Vet Méx 1991; XXII (2): 131-134.

Virtala AMK, Mechor GD, Gröhn YT, Erb HN, Dubovy EJ. Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. J Am Vet Med Assoc 1996; 208 (12): 2035-2042.

Welsh RD, Dye LB, Payton ME, Confer AW. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia. J Vet Diagn Invest 2004; 16: 426-431.

Wray BC, Thompson DA. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. Br Vet 1971; 127: lxvi-lxvii.

Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005; 36: 133-156.

Table 1: Phenotypic characteristics of *Mannheimia* spp. (Mspp) and *P. multocida* (Pm) strains isolated in bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico.

Phenotypic characteristics	Mspp	Pm
	Positive %	
Haemolysis	100	0
Cytochrome oxidase	100	100
Nitrate reduction	100	100
D-Glucose	100	100
D-Sucrose	100	100
D-Mannitol	100	100
β-Galactosidase (ONPG)	97.9	100
Ornithine decarboxylase (ODC)	0	100
Indole	0	100
Trehalose	0	100
Amygdalin <sup>a</sup>	6.6	0
Aesculin <sup>a</sup>	6.6	0
D-sorbitol	15	0
Mc Conkey medium growth	0	0
Gelatinase	0	0
Voges Proskauer	0	0
Arginine dehydrolase	0	0
Inositol	0	0
Citrate	0	0
Motility	0	0
H <sub>2</sub> S	0	0
Urease	0	0
Tryptophane deaminase	0	0
Lysine decarboxilase	0	0
L-Rhamnose	0	0
D-Melobiose	0	0
L-Arabinose	0	0

<sup>a</sup> One of the SGP's isolates was positive to these characteristics and corresponded to S11 (*M. glucosida*).

Table 2: *Mannheimia* spp. serotypes and *P. multocida* biotypes isolated in pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico.

Slaughterhouse	Isolates																				
	Total	<i>Mannheimia spp.</i>										<i>P. multocida</i>									
		N°		%		Mh						Mg		N°		%		A		D	
						S1		S6		NT								N°		%	
						N°	%	N°	%	N°	%							N°	%	N°	%
STL	99	37	37	37	100	13	35	9	24	15	41	0	0	62	63	62	100	0	0		
SGP	32	15	46.8	14	93	4	28.5	0	0	10	71	1	3.1	17	53	16	94	1	5.9		
Total	131	52	39.6	51	98	17	33	9	18	25	49	1	0.8	79	60	78	99	1	1.2		

STL: Slaughterhouse in Tlalnepantla; SGP: Slaughterhouse in Gomez Palacio.

Table 3: Isolating rates of *M. haemolytica* (Mh), *M. glucosida* (Mg) and *P. multocida* (Pm) in pneumonic lungs (PL) in two slaughterhouses in Mexico.

Slaughterhouse	Total PL	<i>Mannheimia spp.</i>				<i>P. multocida</i>	
		Mh.		Mg.		Pm.	
		N°	%	N°	%	N°	%
STL	362	37	10.2	0	0	62	17
SGP	113	14	12.4	1	0.8	17	15
Total	475	51	10.7	1	0.2	79	16.6

STL: Slaughterhouse in Tlalnepantla; SGP: Slaughterhouse in Gomez

Palacio.

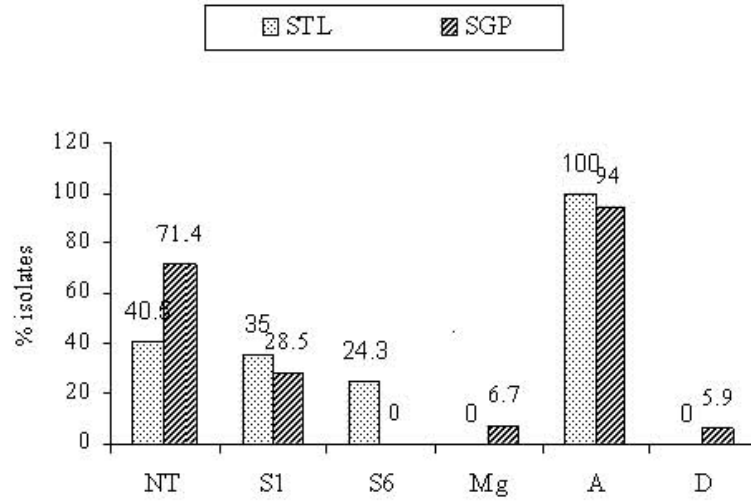


Figure 1: Serotypes of *Mannheimia* spp. strains and biotypes of *P. multocida* strains isolated of bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico.

## **CAPÍTULO VI**

### **Genotypic characterization of *Mannheimia* spp. strains isolated from nasal exudates of bovines from dairy farms in Mexico.**

C.J. Jaramillo-Arango; R. Hernández-Castro; V. Campuzano-Ocampo; F. Suárez-Güemes;  
F. Trigo-Tavera.

# Genotypic characterization of *Mannheimia* spp. strains isolated from nasal exudates of bovines from dairy farms in Mexico

<sup>a\*</sup>C.J. Jaramillo-Arango, <sup>b</sup>R. Hernández-Castro, VM. Campuzano-Ocampo.; <sup>a</sup>F. Suárez-Güemes, <sup>a</sup>F. Trigo-Tavera.

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F., 04510, Mexico.

<sup>b</sup> Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Dirección de Investigación, Secretaría de Salud, Mexico, D.F., 14080, Mexico.

---

## Abstract

We characterized genotypically 122 *Mannheimia* spp. isolates obtained from nasal exudates of clinically healthy (H) and pneumonia sick (PS) bovines and from one reference *M. hemolítica* (Mh) strain. Hundred six of the isolates corresponded to Mh serotype 1 (S1), 10 to S6, and 6 to *M. glucosida* (Mg). DNA was digested with *Hind*III and ribotyping was performed with only one probe containing operon *rrnB* rRNA. We identified 10 ribotype (Rt) patterns with a total of 16 bands, their sizes ranged from 0.78 to 19.7 kb. Most isolates (82%) were grouped in one cluster (Rt1) and corresponded to S1. There were more than one Rt for S1 and S6 of Mh and for Mg, but no Rt was common for the two serotypes or between these and Mg. No differences were detected in the Rt patterns between healthy and sick animals. These results indicate that most strains group within the same Rt (Rt1) forming only one cluster, independently from their origin and all are part of the trehalose-negative [P] *haemolytica* complex that was reclassified within the *Mannheimia* genus.

**Keywords:** *Mannheimia* spp; Ribotyping; Cattle; Mexico.

---

## 1. Introduction

The trehalose-negative [P] *haemolytica* complex was reclassified within the new *Mannheimia* genus that includes, at least, seven species of which five have been named and include: *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis*, *Mannheimia varigena*, *Mannheimia ruminalis*, and *Mannheimia glucosida*. *M. haemolytica* includes serotypes A (1, 2, 5-9, 12-14, 16, and 17) of the former *P haemolytica*. Serotype A11 was reclassified within the new *M. glucosida* species (Angen *et al.*, 1999a; Angen *et al.*, 1999b).

---

\* Corresponding Author: Tel.: +52 55 56225858; fax: +52 55 56225931  
E-mail address: [cja@servidor.unam.mx](mailto:cja@servidor.unam.mx) (CJ. Jaramillo-Arango)



*M. haemolytica* (Mh) is the most pathogenic bacteria and the one most frequently associated with the respiratory tract of bovines, in particular with the bovine pneumonic pasteurellosis, also known as shipping fever (Highlander, 2001). Mh resides in the tonsils and nasopharynx of apparently healthy animals (Rowe *et al.*, 2001; Narayanan *et al.*, 2002); but, in immunocompromised animals due to pre-existing viral infections or stressed due to handling, mainly those younger than 1 year of age or recently transported ones, Mh can descend to the lungs and develop pneumonia (Murphy *et al.*, 1993; Highlander, 2001). Morbidity and mortality associated to this disease causes large economical losses, therefore it is considered as the most relevant disease in terms of economic losses in the bovine industry (Highlander, 2001; Narayanan *et al.*, 2002).

Most *M. glucosida* (Mg) strains have been isolated from the nasal cavity of healthy ovines (Argueta *et al.*, 1988; Angen *et al.*, 1999b), as well as from healthy bovines (Wray and Thompson, 1971) and from pneumonia cases or from other diseases of ovines and bovines (Sisay and Zerihun, 2003; Al-Ghamdi *et al.*, 2000; Narayanan *et al.*, 2002).

Studies on epidemiological characterization require the use of both phenotypic and genotypic methods. Phenotypic methods for the characterization of *Mannheimia* species have been used for a long time, and although their reproducibility is high, its limitations have been widely recognized (Chaslus-Dancla *et al.*, 1996; Angen *et al.*, 2002). Studies performed to assess the specificity of serotyping as a diagnostic tool have demonstrated that it is not a reliable method for the correct identification of Mh, and the need for a wide phenotypic and genotypic characterization is emphasized in order to attain an adequate identification of this microorganism, considering the difficulties posed by other studies for its classification based only on phenotyping and serotyping (Angen *et al.*, 1999b; Angen *et al.*, 2002; Poulsen *et al.*, 2006), and taking into account that the *Mannheimia* genus comprises taxa with a large phenotypic and genotypic heterogeneity (Angen *et al.*, 2002).

Among the molecular typing methods, restriction fragment length polymorphism of the genes encoding for RNAr, or ribotyping, has proven to be a useful tool for molecular epidemiology studies of diverse bacterial species (Blumberg *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 2002; Matthew *et al.*, 2006) and for studies involving *Pasteurella* (Murphy *et al.*, 1993; Chaslus-Dancla *et al.*, 1996; Angen *et al.*, 2002).

No studies have been performed in Mexico for the genomic characterization of *Mannheimia* strains obtained from bovines. In this study, we used ribotyping aimed at determining the characteristics and genotypic differences of *Mannheimia* spp. strains obtained from the nasal exudate of clinically healthy (H) and clinically pneumonia sick (S) bovines from dairy farms located in two important cattle regions of the country.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Bacterial isolates*

Hundred twenty two *Mannheimia* spp. isolates obtained from nasal exudates of bovines were studied: 91 were from clinically healthy bovines (H) and 31 from clinically pneumonia sick bovines (S) from two dairy farms located in two milk producing complexes; one in the Central Valley of Tizayuca (TZY), state of Hidalgo, and the other in the Lagunera Region (RLA) in Central-North Mexico, in the states of Coahuila and Durango. Isolation, identification, and serotyping were performed in previous studies by means of conventional methods of *in vitro* cultures and biochemical and immunologic assays (Jaramillo-Arango *et al.*, 2007, Jaramillo-Arango *et al.*, 2008).

From the studied isolates, 106 were serotype 1 (S1) (S= 80; E= 26), 10 were S6 (S= 9; E= 1), and 6 were S11 (*M. glucosida* [Mg]) (S= 2; E= 4); a reference Mh strain (kindly donated by Dr. GH Frank and Dr. B Briggs, NADC, USDA) was also included.

### *2.2. Ribotyping*

*DNA extraction and digestion, and hybridization technique*

Chromosomal DNA extraction was performed according to Pitcher et al. (1989). Isolates were grown in brain heart infusion (BHI) broth for 18 h at 37°C under orbital shaking at 250 rpm. Bacteria were recovered through centrifugation at 5000 x g during 10 min and the pellet was resuspended in lysis buffer (5 M guanidium thiocyanate, 0.1 M EDTA, 0.5% Sarkosil (p/v), 7.4 M ammonium acetate was added, and all was placed on ice for 10 min. DNA was precipitated with isopropanol, washed two times with 70% ethanol, dried, and resuspended in sterile deionized water, and then stored under refrigeration (0 - 5°C) until further use.

DNA digestion was achieved with the *Hind*III (Invitrogen®) restriction enzyme at 37°C, left overnight, following manufacturer's instructions.

Digestion products were separated through 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide at 20 V for 19 h. DNA was transferred to nylon membranes (0.45 µm) by means of capillary transfer.

The probe containing the *rrnB* rRNA operon of *E. coli* was obtained from the pKK3535 plasmid (Brosius et al., 1981). Briefly, extraction of the pKK3535 plasmid- DNA was achieved with the commercial QIAprep (QIAGEN®) system, the obtained DNA was digested with the *Bcl* I restriction enzyme (New England BioLabs®), according to manufacturer's instructions. The 5.9 bp product containing the *rrnB* operon was purified using the commercial QIAEX II (QIAGEN®) system, and afterwards marked with digoxigenin using the DIG- High Prime (Roche®) system.

### 2.3. Hybridization

Nylon membranes were placed into a pre-hybridization solution at 42° C for 2 h; thereafter, they were placed into a hybridization solution containing a marked probe at 42° C for 16 h (overnight). Membranes were blocked for 1 h and, then, the anti DIG-AP conjugate, diluted 1:20000, was placed in maleic buffer, and membranes were incubated for

30 min. To detect the bands, membranes were covered with 1 mL of the primer reagent (CA Starter- CSPD [Roche<sup>®</sup>]) and exposed to auto-radiographic films (Hyperfilm Amersham Biosciences).

#### 2.4. Data analysis

Ribotype patterns were analyzed by means of the Diversity Database Software, V. 2.0 (Bio-Rad, CA, USA). We elaborated dendrograms to analyze the similarity between isolates and the reference *M. haemolytica* strain by means of the Dice coefficient with maximal similarity. Cluster analysis was performed by means of the Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Averages (UPGMA).

### 3. Results

In the 122 studied isolates, 10 ribotype patterns (Rt1 – Rt10) were identified with a total of 16 hybridization bands, sized from 0.78 to 19.70 kb, by means of total DNA digestion with the *Hind*III restriction enzyme and the hybridization of the *rrnB* ribosomal operon. The number of identified bands varied from 9 as minimum to 14 as maximum (Table 1, Figure 1).

In Mh isolates for S1, Rt1 to Rt 4 were identified; 94% of isolates corresponded to Rt1, which presented hybridization patterns of approximately 0.78, 1.53, 1.92, 2.03, 2.9, 3.27, 4.77, 8.05, 11.80, 14.90, and 19.70 kb; 4 isolates corresponded to Rt3. For Rt2 and Rt4 one isolate was found for each. For S6, Rt5 to Rt8 were identified; 50% (5/10) of the isolates were Rt6, while R5 and Rt8 were present in one isolate each, and Rt7 was found in 3 isolates. In Mg isolates, Rt9 and Rt10 were identified; 83% (5/6) corresponded to Rt10 and one was Rt9. Although there were more than one Rt for each of the Mh and Mg serotypes (6 and 10), none of the isolates was common for both serotypes or between these and Mg (Table 1).

All Rts shared bands of 1.53 and 0.78 kb; Rts of S1 (Rt1 to Rt4) shared bands of 0.78, 1.53, 2.9, 3.27, and 19.7 kb, and lacked the 2.32 kb band. Rts of S6 (Rt5 to Rt8) shared bands of 0.78, 1.0, 1.02, 1.53, 2.9, 3.27, and 8.05 kb, and lacked the 1.7 kb band. Rts of Mg (Rt9 and Rt10) shared bands of 0.78, 1.0, 1.02, 1.53, 1.92, 2.03, and 14.9 kb, and lacked the bands of 1.7, 2.32, 3.7, and 4.77 kb (Table 1).

The genetic relation among the 10 Rts is presented in two dendrograms, one for the TZY isolates and the other for the RLA isolates (Figs. 2 and 3). They depict the estimated degree of similarity between the field isolates and the Mh reference strain. No differences were identified in the Rts between the pneumonia sick animals and the healthy ones.

Dendrograms depict the clusters constituted by 80% similarity; five clusters were identified in the TZY isolates and four in the RLA ones.

In the TZY isolates, most (69%) were grouped in cluster 1 with all S1 isolates of Rt1; with more than 90% similarity among them. Cluster 2 grouped the Rt10 isolates, corresponding to Mg, together with isolates Rt7 (S6) and Rt2 (S1), which showed an 87% similarity. Cluster 3 contains only one isolate of Rt9, which corresponds to Mg, and has a 78% similarity with cluster 2 that contains the Rt10 of Mg. Cluster 4 grouped all S6 isolates of Rt6 and Rt8, together with the Mh reference strain, with an 89% similarity among them. Finally, cluster 5 grouped all S1 isolates of Rt3 and one S6 isolate of Rt5, with a 90% similarity among them and 73% similarity with the Mh reference strain. Clusters 1, 2, and 3 had a 64% similarity with the Mh reference strain (Fig. 2).

In the RLA isolates, most (90%) formed cluster 1 with a 90% similarity among them, grouping 98% of the S1 isolates of Rt1, as one isolate of this same Rt1 was grouped in cluster 2. Cluster 3 grouped isolates S6 with Rt6 and Rt7, as well as the S1 of Rt4 together with the Mh reference strain. These were the isolates most closely related with the Mh reference strain with a more than 80% similarity. Cluster 4 included only one S1 isolate of

Rt3, with barely 58% similarity with the rest of the clusters. Clusters 1 and 2 had a 78% similarity with the Mh reference strain (Fig. 3).

#### **4. Discussion**

Most of the studies on Mh performed in Mexico have focused on the phenotypic characterization of the microorganism. In the present study, characterization of the *Mannheimia* spp. isolates obtained from nasal exudates of bovines was confirmed by ribotyping based on the results from previous studies (Jaramillo-Arango *et al.*, 2007; Jaramillo-Arango *et al.*, 2008). The usefulness of a given characteristic used for typing is based on its stability in a given strain and on the diversity among the strains constituting a species; both criteria were fulfilled in the *el rrm* operon, which is the characteristic analyzed by means of ribotyping (Lobato *et al.*, 1998).

For both TZY and RLA, most S1 isolates were grouped in Rt1 in an almost homogeneous cluster, which agrees with Kodjo *et al.* (1999) in a study performed with *P. haemolytica* strains using the *Hind*III restriction enzyme; the same situation occurred with the S6 and Mg isolates of TZY that were mostly grouped in Rt6 and Rt10, respectively. These findings suggest that most S1, S6, and Mg isolates of TZY and S1 isolated of RLA were not distinguishable genetically, as within the corresponding cluster they shared the same ribotype with the same number of bands, which apparently are of the same size. From an epidemiological point of view, it can be considered that these isolates correspond to a same strain within each cluster grouping S1, S6, and Mg.

In this sense, we found multiple Rt patterns that corresponded to only one serotype, which agrees with the finding by Snipes *et al.* (1992) when using serotyping with indirect hemagglutination (IHA); however, when using fast plate agglutination, multiple Rt patterns were found corresponding to only one serotype, as well as multiple serotypes corresponding to the same Rt, suggesting the existence of multiple strains within a given

serotype. According to Snipes *et al.* (1989), these isolates of the same serotype but different Rt could be strains with different genotypes, possessing in their genome portions encoding the production of determined similar antigens that would allow them to share the genotype. But these strains could also have important portions of the genome that are different, which could indicate a variation in genes among the rRNA operons, as the latter are highly conserved and are not subject to frequent mutations.

Ribotyping results reveal a partial agreement with those from the preliminary phenotypic identification, as ribotyping grouped most of the S1, S6, and Mg isolates in separate clusters, with more than 90% similarity (Figs 2 y 3). This is very similar to the findings by Angen *et al.* (2002), who reported a total agreement between the ribotyping results and previous phenotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains. Notwithstanding, isolates of different serotypes and ribotypes were grouped occasionally in a same cluster.

In this study, the *Hind*III restriction enzyme proved to be very useful for the ribotyping of *Mannheimia* spp. strains, which coincides with other studies (Chalus-Dancla *et al.*, 1996; Kodjo *et al.*, 1999; Blackall *et al.*, 2001; Angen *et al.*, 2002) but differs from the findings by Murphy *et al.* (1993), who was unable to identify different ribotypes among Mh S1 isolates. This could explain why, in that study, only 22 isolates of the mentioned serotypes were obtained from one dairy farm; whereas, in the present study, we found 106 isolates coming from different dairy farms and geographical areas.

Although the value of ribotyping to calculate taxonomic distances among strains or to differentiate isolates has been questioned (Saxena *et al.*, 2005), this tool has shown its validity for the classification and grouping of diverse bacteria, including the *Pasteurellaceae* family (Blackall *et al.*, 2001). This is evidenced considering that a correlation has been demonstrated between clusters obtained by ribotyping and cluster

obtained through multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) for both *P. multocida* and *M. haemolytica* (Angen *et al.*, 1997; Blackall *et al.*, 1998), as well as a correlation between MLEE-determined clusters and the determination of DNA homology through DNA:DNA hybridization of diverse bacteria (Ochman *et al.*, 1983; Gilmour *et al.*, 1987).

According to our results, ribotyping was useful to distinguish isolates of the same species and of different species of the same genus, coinciding with results from other studies with *Mannheimia* spp. (Snipes *et al.*, 1992; Kodjo *et al.*, 1999; Chaslus-Dancla *et al.*, 1996; De Rosa *et al.*, 2000; Blackall *et al.*, 2001), or with other bacteria of the *Pateurellaceae* family (Sarafian *et al.*, 1991; Snipes *et al.*, 1989; De Rosa *et al.*, 2000). However, our results contrast with other studies that consider that ribotyping might not be useful to distinguish species of the same genus (Murphy *et al.*, 1993; Saxena *et al.*, 2005). Our results confirm that ribotyping is a reliable technique to classify and identify strains of the *Mannheimia* complex (Angen *et al.*, 1997) and, that together with IHA serotyping, it is useful in epizootologic studies for the characterization of *Mannheimia* spp. isolates (Snipes *et al.*, 1992).

In conclusion, the genotypic characterization of the strains analyzed in this study shows that most of them are grouped within the same Rt (Rt1), forming only one cluster, independently from their origin and indicates that all strains are part of the trehalose-negative [P] *haemolytica* complex, which was reclassified within the *Mannheimia* genus.

### **Acknowledgements**

C.J., Jaramillo-Arango received scholarship No. 180224 from CONACyT (Mexican National Council for Science and Technology). This study was financed by CONACyT (Project G38590-B). We would like to thank the livestock breeders of the dairy farms in the States of Hidalgo, Coahuila and Durango, Mexico, and Ingrid Mascher for her valuable suggestions and comments in the present manuscript.



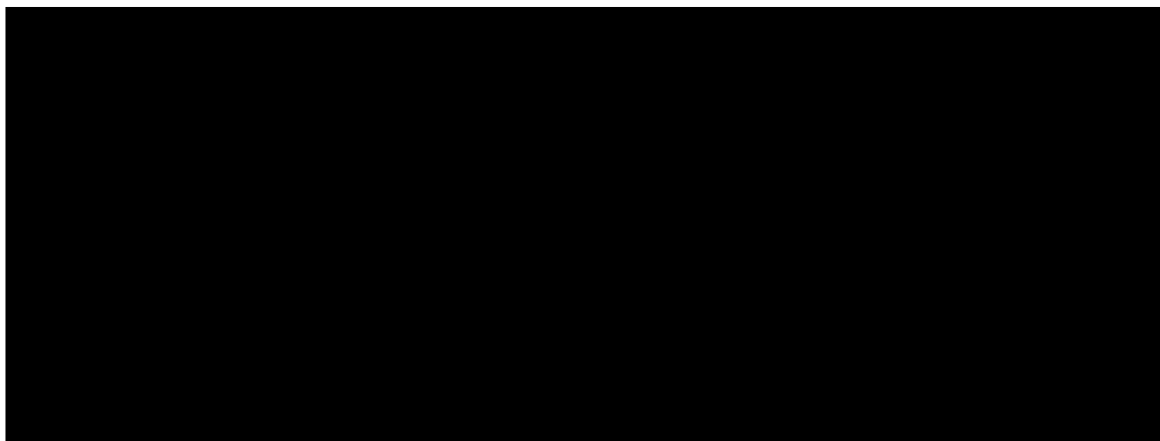
## References

- Al-Ghamdi, G.M., Ames TR, Baker JC, Walker R, Chase CC, Frank GH, Maheswaran SK., 2000. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 576-8.
- Anderson, A.M., Whitlock, J.E., Harwood, V.J., 2006. Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle and horses. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6914-6922.
- Angen, O., Caugant, D.A., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1997. Genotypic relationships among strains classified under the (*Pasteurella*) *haemolytica*-complex as indicated by ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis. Zentralb. Bakteriologie. 286, 333-354.
- Angen, O., Mutters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1999a. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16SrRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen., comb.nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 67-86.
- Angen, O., Quirie, M., Donachie, W., Bisgaard, M., 1999b. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. Vet. Microbiol. 65, 283-290.
- Angen, O., Ahrens, P., Bisgaard, M., 2002. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. Vet. Microb. 84, 103-114.
- Argueta, G.J., Mercado, P.M., Trigo, T.F.J., 1988. Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Vet. Méx. 19, 93-97.
- Blackall, P.J., Fegan, N., Chew, G.T.I., Hampson, D.J., 1998. Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. Microbiology. 144, 279-289.
- Blackall, P.J., Angen, O., Fegan, N., Blackall, L.L., Mutters, R., Bisgaard, M., 2001. Characterisation of a novel *Mannheimia* sp from Australian feedlot cattle. Aust. Vet. J. 79, 634-639.
- Blumberg, H.M., Stephens, D.S., Licitra, C., Pigott, N., Facklam, R., Swaminathan, B., Wachsmuth IK., 1992. Molecular epidemiology of group B streptococcal infections: use of restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA and DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms of ribosomal RNA genes (Ribotyping). J. Infect. Dis. 166, 574-759.
- Brosius, J., Ullrich A., Raker, M.A., Gray, A., Dull, T.J., Gutell, R.R., Noller, H.F., 1981. Construction and fine mapping of recombinant plasmid containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. Plasmid. 6, 112-118.
- Chaslus-Dancla, E., Lesage-Descauses, M.C., Leroy-Sétrin, S., Martel, J.L., Courdet, P., Lafont, JP., 1996. Validation of random amplified polymorphic DNA assays for ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. Vet. Microbiol. 52, 91-102.
- Christensen, H., Dziva, F., Olsen, JE., Bisgaard, M., 2002. Genotypic heterogeneity of *Pasteurella gallinarum* as shown by ribotyping and 16S rRNA sequencing. Avian. Pathol. 31, 603-610.
- DeRosa, D.C., Mechor, G.D., Staats, J.J., Chengappa, M., Shryock, T.R., 2000. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal

- swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.* 38, 327-332.
- Gilmour, M.N., Whittam, T.S., Kilian, M., Selander, R.K., 1987. Genetic relationship among oral streptococci. *J. Bacteriol.* 169, 5247-5257.
- Highlander, S.K., 2001. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia*. *Frontiers in Bioscience.* 6, 1128-1150.
- Jaramillo-Arango, C.J., Hernández-Castro, R., Suárez-Güemes, F., Martínez-Maya, J.J., Aguilar-Romero, F., Jaramillo-Meza, L., Trigo, F.J., 2007. Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico. *J. Anim. Vet. Adv.* 6, 404-409.
- Jaramillo-Arango, C.J., Hernández-Castro, R., Suárez-Güemes, F., Martínez-Maya, J.J., Aguilar-Romero, F., Jaramillo-Meza, L., Trigo, F.J., 2008. Characterisation of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudates and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. *Res. Vet. Sci.* 84, 7-13 (in press).
- Kodjo, A., Villard, L., Bizet, Ch., Martel, J.L., Sanchis, R., Borges, E., Gauthier, D., Maurin, F., 1999. Richard Y. Pulse-Field Electrophoresis is more efficient than Ribotyping and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37, 380-385.
- Lobato, M.J., Landeras, E., González-Hevia, MA., Mendoza, M.C., 1998. Genetic heterogeneity of clinical strains of *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and relationships between ribotypes, serotypes, and biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3297-3302.
- Murphy, G.L., Robinson, L.C., Burrows, G.E., 1993. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *Clin. Microbiol.* 31, 2303-2308.
- Narayanan, SK., Nagaraja, T.G., Chengappa, M.M., Stewart, G.C., 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet. Microbiol.* 84, 337-356.
- Ochman, H., Whittam, T.S., Caugant, D.A., Selander, R.K., 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2715-2726.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 151-158.
- Poulsen, L.L., Reinert, T.M., Sand, R.L., Bisgaard, M., Christensen, H., Olsen, JE., Stuen, S., Bojensen, AM., 2006. Occurrence of haemolytic *Mannheimia* spp. in apparently healthy sheep in Norway. *Acta. Vet. Scand.* 48(1): 19. Published online 2006 October 31. doi: 10.1186/1751-0147-48-19.
- Rowe, H.A., Poxton, I.R., Donachie, W., 2001. Survival of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Vet. Microbiol.* 81, 305-314.
- Sarafian, S.K., Woods, T.C., Knapp, J.S., Swaminathan, B., Morse, S.A., 1991. Molecular characterization of *Haemophilus ducreyi* by ribosomal DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1949-1954.
- Saxena, M.K., Kumar, A.A., Chaudhari, P., Shivachandra, S.B., Singh, V.P., Sharma, B., 2005. Ribotyping of Indian isolates of *Pasteurella multocida* based on 16S and 23S rRNA genes. *Vet. Res. Commun.* 29, 527-535.
- Sisay, T., Zerihun, A., 2003. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the Highlands of Wollo, North East Ethiopia. *Vet. Res. Communic.* 27, 3-14.

- Snipes, K.P., Hirsh, D.C., Kasten, R.W., Hansen, L.M., Hird, D.W., Carpenter, T.E., McCapes, R.H., 1989. Use of an rRNA probe and Restriction Endonuclease Analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife. J. Clin. Microbiol. 27, 1847-1853.
- Snipes, K.P., Kasten, R.W., Wild, M.A., Miller, M.W., Jessup, D.A., Silflow, R.L., Foreyt, W.J., Carpenter, T.E., 1992. Using ribosomal RNA gene restriction patterns in distinguishing isolates of *Pasteurella haemolytica* from bighorn sheep (*Ovis canadensis*). J. Wildlife. Dis. 28, 347-354.
- Wray, B.C., Thompson, D.A., 1971. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. Br. Vet. 127, lxvi-lxvii.

Table 1. Ribotype (Rt) patterns according to the DNA bands size (kb) identified in *M. haemolytica* and *M. glucosida* isolates obtained from nasal exudates of bovines in Mexico.



0: Absent band; 1: Present band

Figure1. Schematic representation of the 10 ribotypes (Rt1 – Rt10) obtained from *M. haemolytica* and *M. glucosida* isolates from nasal exudates of bovines.

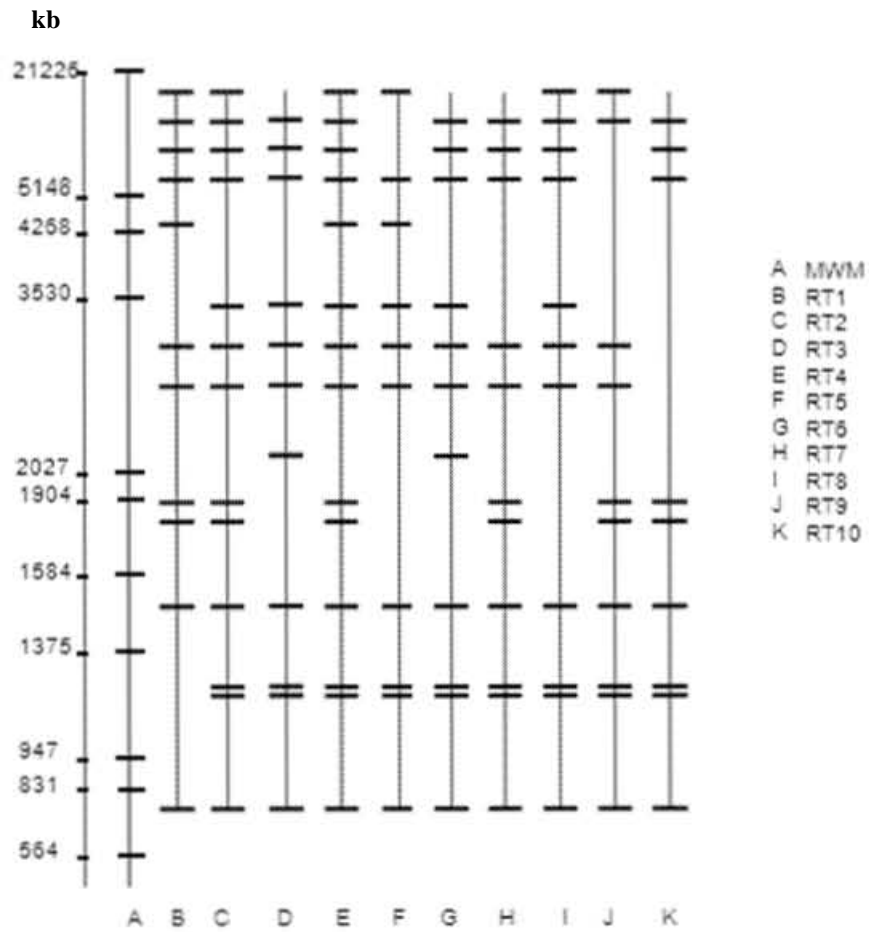


Figure 2. Dendrogram (UPGMA) of ribotypes (Rts) obtained with *Hind*III showing the similarity (Dice coefficient) among *M. haemolytica* and *M. glucosida* isolates obtained from nasal exudates of healthy (H) and pneumonia sick (S) bovines of the Valle Central de Tizayuca, Mexico.

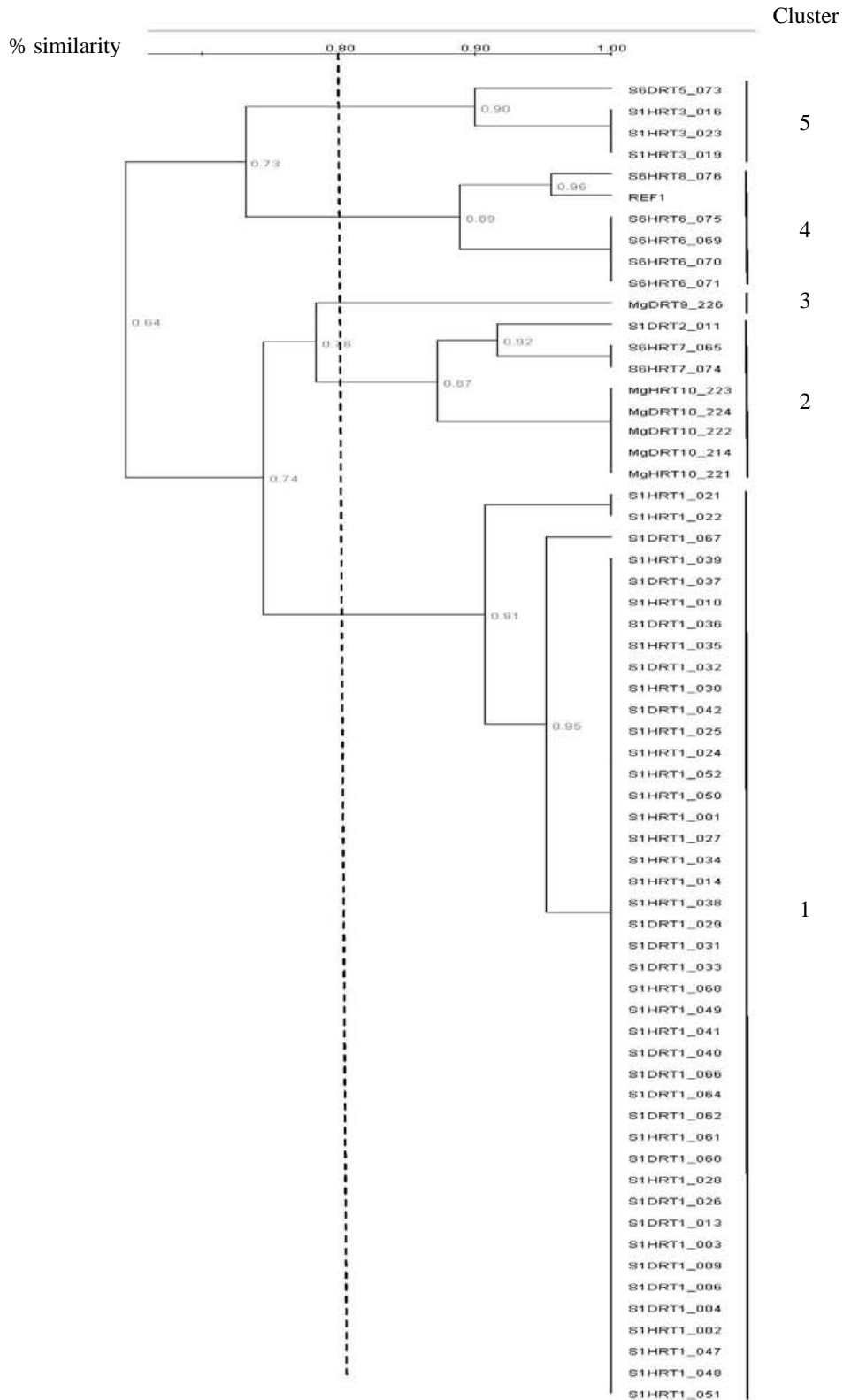
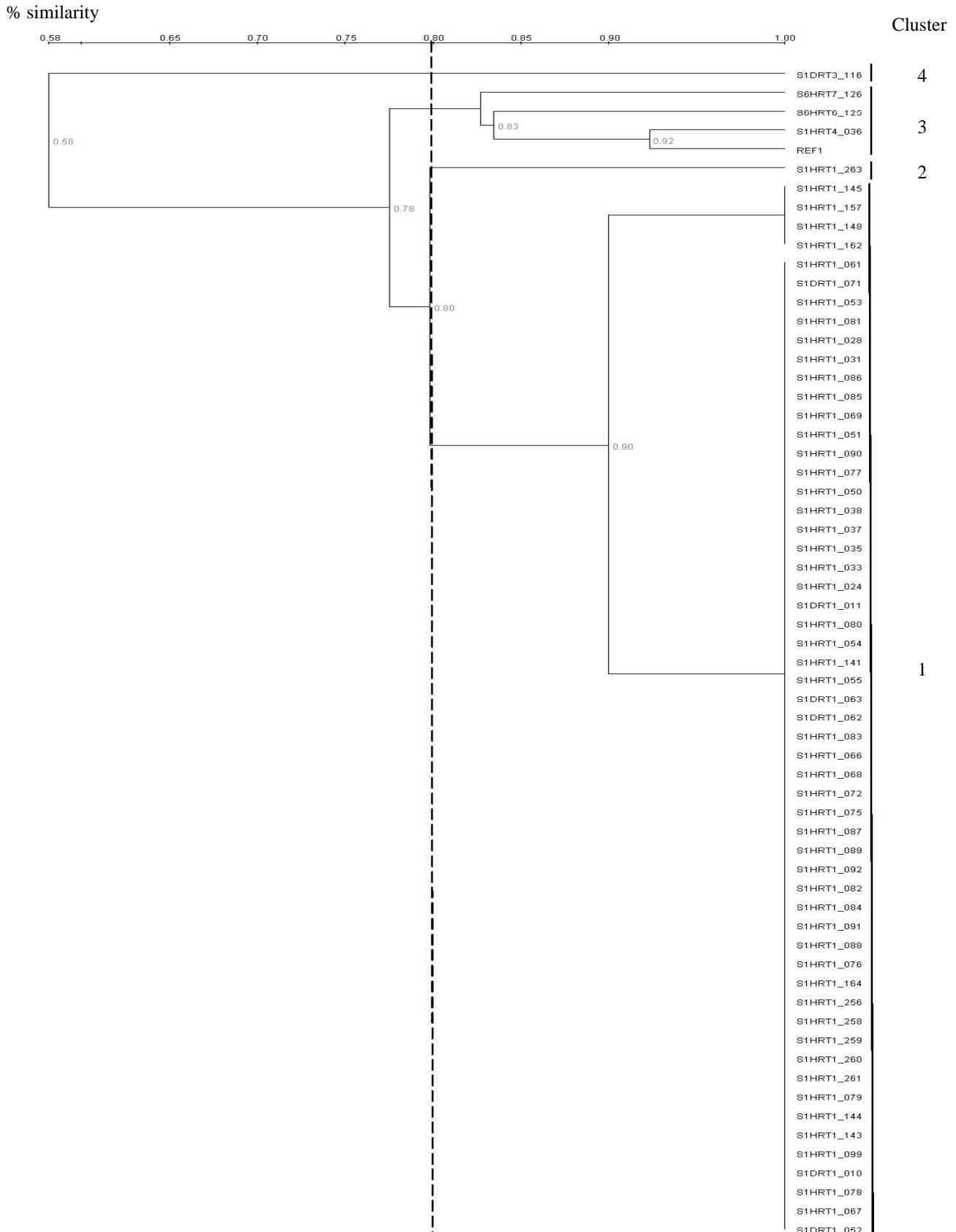


Figure 3. Dendrogram (UPGMA) of the ribotypes (Rts) obtained with *Hind*III showing the similarity (Dice coefficient) among *M. haemolytica* and *M. glucosida* isolates obtained from nasal exudated of healthy (H) and pneumonia sick (S) bovines in the Región Lagunera (Mexico).



## **CAPÍTULO VII**

### **Discusión General**



## Discusión General

Los datos sobre frecuencias o prevalencias de Mh tanto en el ámbito mundial como en México, son a veces contradictorios y no muy precisos. Diversos estudios informan sobre el predominio de algunos de los serotipos de Mh. En Dinamarca se reportan frecuencias que van del 1 al 67% de los diversos serotipos de Mh en material patológico bovinos (Angen *et al.*, 2002), en Turquía se informa de un 40% de aislamientos de *P. haemolytica* en pulmones de becerros (Hazioglu *et al.*, 1997) y de 12% en pulmones de ovejas (Kirkan and Kaya, 2005), en el Reino Unido se reporta un 56% de aislamientos de Mh A1 en pulmones de bovinos (Quirie *et al.*, 1986 citado por Angen *et al.*, 2002), en Estados Unidos de Norteamérica, en exudados nasales obtenidos de becerros, se informa de un 17% de prevalencia de Mh (Frank and Smith, 1983), en Perú, en casos de neumonía aguda en bovinos, se reporta 15% en pulmones y 25% en exudados nasales (Zanabria *et al.*, 2000); en Libia se informa de un 5.4% de aislamientos de Mh A2 en exudado nasal de ovejas (Moustafa, 1994), en Etiopia se informa de los aislamientos de Mh en ovejas, 59% en pulmones y tonsilas, y 13% en exudado nasal (Sisay and Zerihum, 2003).

La información sobre frecuencias, prevalencias o incidencias que reportan los estudios hechos en México, es escasa e igualmente heterogénea. Los diferentes estudios realizados hasta la fecha informan datos de incidencias que van del 19.7 al 39.9% en becerras (Pijoan y Chávez, 2003), aislamientos de cepas de *P. haemolytica* del 12% en exudado nasal de ovinos (Argueta *et al.*, 1988) y del 25 al 35% en pulmones de ovejas o becerros (Blanco *et al.*, 1993; Blanco-Viera *et al.*, 1995; Pijoan *et al.*, 1999).

Todos estos estudios han sido hechos con muestras intencionadas obtenidas en su mayoría de centros de diagnóstico, rastros y en menor proporción de unidades pecuarias, razón por la cual los valores de las tasas de prevalencia o incidencia resultan bastante cuestionables, ya que dichas muestras no son suficientemente representativas, ni en cantidad ni en calidad,

de las poblaciones de referencia, de tal manera que las tasas obtenidas no permiten hacer inferencias válidas respecto a dichas poblaciones (Martin *et al.*, 1997).

En el presente estudio se realizaron muestreos aleatorios de las poblaciones de referencia, tanto del CAIT como de la CLALA, de tal manera que las frecuencias de aislamiento obtenidas en exudado nasal constituyen las tasas de prevalencia para cada una de las dos cuencas. En ambas cuencas a partir de las tasas de prevalencia aparente (TPA) obtenidas se pudo inferir, con un 95% de confianza, las tasas de prevalencia verdadera (TPV). En el CAIT en los bovinos CSN, de acuerdo a la TPA de Mh (18%) la TPV se encuentra entre el 15 y el 20%, y según la TPA de Mg (0.4%) la TPV está entre - 0.057 y 0.9%; y en los bovinos CEN según la TPA de Mh (30.4%) la TPV está entre 23.9 y 36.8%, y de acuerdo a la TPA de Mg (1.5%) la TPV se haya entre - 0.19 y 3.2%. Para el caso de la CLALA, en los bovinos CSN según la TPA de Mh (5.4%) la TPV varía entre 4.3 y 6.4%; y en los bovinos CEN de acuerdo a la TPA (12.7%) la TPV se encuentra entre 7.9 y 17.4%.

Estos resultados son parcialmente comparables con los obtenidos en las investigaciones descritas anteriormente, tanto del extranjero como nacionales, teniendo en cuenta, como ya se ha mencionado, que las muestras utilizadas en dichos estudios son muy diferentes en cuanto a sus características y el origen de las mismas. Frank and Smith, (1983) reportan una frecuencia de 17% en exudado nasal de becerros CSN, la cual es muy similar a la TPA en CSN en el CAIT (18%) y muy superior a la TPA en la CLALA (5.4%), por su parte Wray y Thompson (1971), reportan una frecuencia de 87.7% de aislamientos de *P. haemolytica* en exudado nasal de becerros CSN, cifra muy superior a las TPA tanto del CAIT como de la CLALA. En cuanto a los CEN, Sisay y Serihun (2003), informan una frecuencia de aislamientos de Mh 13% pero en ovejas, la cual es prácticamente igual a la TPA en CEN del la CLALA (12.7%) e inferior a la del CAIT (30.4%).

Las diferencias de las TPA observadas entre las dos cuencas fueron significativas, mostrando que fueron mayores en el CAIT que en la CLALA, de tal manera que entre los CSN fueron más de tres veces mayores y entre los CEN más de dos veces mayores, lo cual es compatible con las condiciones predominantes en ambas cuencas; mientras que en el CAIT los establos están ubicados todos uno junto a otro (un “condominio” de establos), y la mayoría las medidas de bioseguridad, desarrollo tecnológico y manejo, entre otras, presentan serias deficiencias, en la CLALA la mayoría de los establos manejan un gran número de animales (2 500 en promedio), lo cual los obliga a mantener dichas medidas con mayor eficacia y eficiencia.

El aislamiento y la fenotipificación de las cepas se realizó mediante los métodos convencionales de cultivo *in vitro*, tinción, pruebas bioquímicas y pruebas inmunológicas, para determinar la morfología de colonias y bacterias, la producción de hemólisis, su comportamiento bioquímico e inmunológico para su identificación, biotipificación y serotipificación (Biberstein, 1978; Cowan y Steels, 1979; Quinn *et al.*, 1994; Angen *et al.*, 1999a).

No obstante que se ha podido demostrar que la reproducibilidad de los métodos fenotípicos para caracterizar las especies de *Mannheimia* es alta (Angen *et al.*, 2002), diversos autores coinciden en que la serotipificación por HAI por sí sola no es un método suficientemente específico para la identificación confiable de *M. haemolytica*, en tanto no esté apoyada por un número amplio de pruebas bioquímicas (Angen *et al.*, 1999b; Angen *et al.*, 2002), teniendo en cuenta que el género *Mannheimia* abarca taxones de una gran heterogeneidad fenotípica y genotípica (Angen *et al.*, 2002).

Por lo anterior, se decidió que a todos los aislamientos se les hiciera primero pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos y producción de H<sub>2</sub>S (TSI), utilización del citrato, motilidad, producción de indol, producción de ureasa y fermentación de la esculina,

y pruebas bioquímicas adicionales con el sistema comercial de identificación API 20 E<sup>®</sup>. Este sistema originalmente fue diseñado para la identificación rápida de enterobacterias, tras las modificaciones hechas, algunos investigadores han comprobado que también funciona para las no enterobacterias (Collins and Swason, 1981), y que puede ser usado como una herramienta confiable de identificación de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (Erasmus, 1983; Zanabria *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Katsuda, 2007), de hecho, el uso de kits comerciales para la identificación de *M. haemolytica* ha sido reportado de hace muchos años (Groom *et al.*, 1986; Salmon *et al.*, 2000, citados por Angen *et al.*, 2002) y se ha comprobado que constituyen un método de amplio uso que contribuyen para lograr una identificación de especie rápida y confiable (Angen *et al.*, 2002).

Entre las pruebas bioquímicas más importantes por su estabilidad para la fenotipificación del género *Mannheimia* se encuentran la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) y de la  $\beta$ -galactosidasa (ONPG), además de la capacidad de fermentación de la arabinosa, la trealosa y el sorbitol (Angen *et al.*, 2002).

La diferenciación de las cepas aisladas en el CAIT, la CLALA, el RMTL y el RMGP, sobre la base de los resultados negativos a la fermentación de la arabinosa y la trealosa, y los resultados positivos a la hemólisis, la actividad de la ODC y de la ONPG, estuvo de acuerdo con lo reportado en la literatura (Angen *et al.*, 1999a; Blackall *et al.*, 2001; Angen *et al.*, 2002; Blackall *et al.*, 2002; Catry *et al.*, 2004). No obstante que en la mayoría de las cepas aisladas el resultado negativo a sorbitol difiere con algunos (Catry *et al.*, 2004; Angen *et al.*, 2002; Angen *et al.*, 1999a) coincide con otros que lo consideran dudoso en algunas cepas (Blackall *et al.*, 2001); adicionalmente, difiere también con lo encontrado por Erasmus (1983), quien al comparar una cepa de referencia de Mh (I29) con otras cepas de campo encontró que dicha cepa pudo fermentar glucosa, inositol, sorbitol y arabinosa.

Vale la pena resaltar algunas de las características fenotípicas de los aislamientos. La hemólisis fue débil y muy poco evidente en agar adicionado con sangre de bovino, sin embargo se hizo evidente cuando estuvo adicionado de sangre de ovino, este comportamiento contrasta con lo reportado por algunas publicaciones en las que se aislaron cepas de Mh que mostraron hemólisis débil en agar tanto con sangre de bovino como de ovino (Blackall *et al.*, 2001), o que no mostraron hemólisis como sería lo esperado en los aislamientos clásicos de Mh (Erasmus, 1983). Por otra parte, ninguno de los aislamientos de este estudio fermentó la arabinosa ni se desarrolló en agar McConkey, en coincidencia con lo encontrado por diversos autores (Blackall *et al.*, 2001; Blackall *et al.*, 2002; Catry *et al.*, 2004; Kirkan and Kaya, 2005); tampoco produjeron H<sub>2</sub>S, de acuerdo con lo que se reporta en la literatura (Erasmus, 1983; Angen *et al.*, 1999a; Blackall *et al.*, 2001; Angen *et al.*, 2002, Blackall *et al.*, 2002; Sisay and Zerihun, 2003; Catry *et al.*, 2004) aunque contrasta con lo reportado por Kirkan y Kaya (2005) quienes informan de aislados de Mh que produjeron H<sub>2</sub>S.

La mayoría de las cepas fermentaron el manitol (97.3 – 100%), la sacarosa (69.5 – 100%) y la glucosa (48.6 – 93.3%) y sólo una minoría lo hicieron con el inositol (13.5 – 40) y con el sorbitol (15 – 33.3%); estas variaciones en el comportamiento bioquímico de algunas cepas aisladas también ha sido informado por diferentes trabajos tanto en cepas de campo como en cepas de referencia (Blackall *et al.*, 2001; Blackall *et al.*, 2002; Sisay and Zerihun, 2003; Kirkan and Kaya, 2005). Lo anterior confirma lo señalado por algunos autores en cuanto a las dificultades que se enfrentan en los laboratorios para el diagnóstico y la correcta identificación de los miembros del género *Mannheimia* (Angen *et al.*, 1999b; Blackall *et al.*, 2002).

Las cepas NT fueron las más frecuentes tanto en exudados nasales en CSN (45-69%) como en CEN (60-67%), así como en pulmones neumónicos (40.5-66.6%), estos resultados

difieren y son muy superiores a lo encontrado por diversos investigadores tanto nacionales como extranjeros. En México se han reportado frecuencias de NT de 9.6 a 18% en pulmones de becerras (Pijoan *et al.*, 1999; Jaramillo *et al.*, 1987) y de 7 hasta 27% en exudado nasal (Argueta *et al.*, 1988) o en pulmones neumónicos (Colin *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1993; Blanco-Viera *et al.*, 1995) de ovinos. En países como Dinamarca (Angen *et al.*, 2002) o el Reino Unido (Quirie *et al.*, 1986 citado por Angen *et al.*, 2002) se han reportado frecuencias entre el 24 y el 25% en pulmones neumónicos de becerros; en pulmones neumónicos de vacas en Estados Unidos (Al-Ghamdi *et al.*, 2000) y de vacas, cerdos y ovejas en Dinamarca (Angen *et al.*, 2002) hasta un 41%; en exudado nasal de becerros se ha reportado 9.3% en la Gran Bretaña (Wray and Thompson, 1971) y 15.8% en ovinos del medio oeste de los Estados Unidos (Frank *et al.*, 1982). Las frecuencias más bajas se han reportado en pulmones de ovinos con 3.6% en Etiopía (Sisay and Serihun, 2003), 7% en Hungría (Fodor and Varga, 1988) y 8.3% en Turquía (Kirkan and Kaya, 2005).

Las frecuencias de aislamiento de estas cepas NT son muy variables y según algunos autores el número puede ser alto en algunos casos (Fraser *et al.*, 1982b; Davies *et al.*, 1996) y generalmente corresponden al biotipo A (Frank *et al.*, 1980 citado por Fodor and Varga, 1988); estas cepas han sido descritas como mutantes de Mh, las cuales quizá han perdido su habilidad de producir polisacáridos capsulares (Gentry *et al.*, 1988 citado por Kirkan and Kaya, 2005); también se ha podido demostrar que los patrones de fermentación de azúcares de muchas cepas NT difieren de los de aislamientos clásicos del biotipo A de Mh, y basados en las diferencias de las características bioquímicas se han descrito los 12 grupos dentro del complejo de *P. haemolytica* y algunos de esos biogrupos pueden representar nuevas especies (Davies *et al.*, 1996).

Entre las cepas serotificables en exudado nasal se aislaron los serotipos (S) 1, 6 y 11, y el S1 fue el más prevalente tanto en el CAIT como en la CLALA y en cada uno de los grupos

de bovinos CEN y CSN, estos resultados concuerdan con lo reportado por diferentes autores quienes coinciden que el S1 es el más frecuente en bovinos (Colin *et al.*, 1987; Burrows *et al.*, 1993; Pandher *et al.*, 1999; Pijoan *et al.*, 1999; Highlander, 2001; Lo RYC, 2001; Narayanan *et al.*, 2002; Zecchinon *et al.*, 2005), con frecuencias hasta del 50% (Wray and Thompson, 1971), sin embargo, existen diferencias con lo observado por otros autores. Frank and Smith (1983), encontraron que el S2 predominaba en exudado de becerros en granja, pero cuando estos animales eran trasladados a corrales de subasta y de ahí a corrales de engorda el serotipo que predominó fue el S1; esto quizá se deba a lo mencionado por diversos autores que resaltan la presencia del S2 como el más común en los bovinos sanos en el tracto respiratorio superior, pero después de un estado de estrés o de una infección viral, el S1 rápidamente reemplaza al S2 como el serotipo principal; lo cual probablemente se deba a una transmisión horizontal a partir de animales enfermos que tengan el S1 activo en secreciones nasales (Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005). Estudios hechos con lavados traqueo-bronquiales también reportan el S1 como el más frecuente en bovinos y el S2 como el más frecuente en ovinos (Rowe *et al.*, 2001).

En México no hay estudios publicados hechos con exudado nasal de bovinos, diversos autores reportan que la frecuencia de aislados en general es baja en hisopos nasales de animales sanos y no estresados, y alta en becerros con enfermedad del tracto respiratorio (Carter *et al.*, 1955, Thompson *et al.*, 1975, citados por Frank and Smith, 1983), esto coincide con las prevalencias halladas en este estudio las cuales fueron mayores en los animales CEN.

En las muestras de tejido pulmonar también las frecuencias de las cepas serotificables siguieron el mismo patrón que en los exudados nasales, y el S1 fue el más frecuente (33%). Estas frecuencias fueron menores que lo encontrado en bovinos en México por diferentes investigadores que reportan frecuencias entre el 50 y 83.9% (Jaramillo *et al.*, 1987, Blanco-

Viera *et al.*, 1995, Pijoan *et al.*, 1999). En ovinos se han reportado frecuencias menores entre el 11 y el 22% (Colin *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1993). En otros países también se han reportado frecuencias mayores a las encontradas en este estudio; en bovinos en Dinamarca se ha reportado un 67% (Angen *et al.*, 2002), en el Reino Unido 56% (Quirie *et al.*, 1986 citado por Angen *et al.*, 2002) en Japón 49% (Katsuda *et al.*, 2007); frecuencias menores han sido reportadas en becerros en Turquía (4.2%) (Haziruglu *et al.*, 1997) y en ovinos en Etiopía (17%) (Sisay and Zerihun, 2003).

Independientemente de la variación en las frecuencias reportadas en el país o en el extranjero, se confirma que el serotipo más frecuentemente aislado de bovinos es el 1, y tanto en Europa como en Norte América constituye el serotipo más frecuentemente reportado en pulmones de bovinos (Rowe *et al.*, 2001; Angen *et al.*, 2002); sin embargo hay diferencias con diversos estudios sobre aislamiento y serotipificación que indican que el S2 es el más prevalente en animales sanos y el S1 es el más frecuente en animales enfermos (Frank, 1982; Frank and Smith, 1983; Rowe *et al.*, 2001) ya que en esta investigación el S1 fue el que predominó entre las cepas serotificables tanto en bovinos CSN como en los CEN.

El S6 que en este estudio fue encontrado tanto en exudado nasal como en pulmones neumónicos, en México sólo ha sido reportado en pulmones de ovinos (Blanco *et al.*, 1993) y en pulmones de bovinos (Blanco-Viera *et al.*, 1995). En otros países ha sido reportado en pulmones de ovinos, en Gran Bretaña (Fraser *et al.*, 1982a), en Etiopía (Sisay and Zerihun, 2003), en Hungría (Fodor *et al.*, 1984, citado por Sisay and Zerihun, 2003), en Turquía (Kirkan and Kaya, 2005) y en pulmones de bovinos en Estados Unidos (Al-Ghamdi *et al.*, 2000) y Japón (Katsuda *et al.*, 2007) con frecuencias que varían del 7 al 26%. La incidencia de este serotipo se ha incrementado en Europa, Estados Unidos y Japón (Katsuda *et al.*, 2007).



El aislamiento del S11 (*M. glucosida*) en exudado nasal de bovinos que se logró en este estudio es el primero reportado en el país ya que sólo ha sido aislado en exudado de corderos y ovinos adultos (Argueta *et al.*, 1988). Este serotipo también ha sido aislado en exudado de becerros en el Reino Unido (Wray and Thompson, 1971).

No existen en México estudios publicados enfocados a evaluar la prevalencia de Mh y su patrón de comportamiento con respecto a factores condicionantes como la edad, estado de salud u otros factores determinantes. La mayoría de los estudios hechos en el país y en el extranjero se concentran fundamentalmente en los aspectos clínicos y de patogenicidad del género *Mannheimia*.

Los resultados de este estudio, en cuanto a las diferencias significativas en los aislamientos de Mh en los CSN y los CEN, y en los mayores y menores de un año en ambas cuencas, permiten confirmar que los aislamientos de los microorganismos del género *Mannheimia* son más frecuentes en bovinos jóvenes, especialmente en los menores de un año, y en los animales enfermos ya que estas dos condiciones fueron consistentemente los grupos más expuestos tanto en el CAIT como en la CLALA; esto coincide con lo señalado por diversos autores (Colin *et al.*, 1987; Burrows *et al.*, 1993; Pandher *et al.*, 1999; Pijoan *et al.*, 1999; Lo RYC, 2001; Narayanan *et al.*, 2002; Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005).

Se sabe que en las becerras diversos factores determinan la presentación y severidad de las lesiones neumónicas, y destacan aquellos relacionados con el manejo y que generan estrés tales como: suministro de calostro, calidad del mismo, tipos de alojamiento, presencia de gases producto de heces u orina en los alojamientos, entre otros (Pijoan *et al.*, 1999), sin embargo, aunque en los resultados de este estudio hubo diferencias en las frecuencias de aislamiento según el tipo de alojamiento, estas no fueron significativas, de hecho no hubo consistencia entre una y otra cuencas ya que mientras en el CAIT las mayores frecuencias se dieron en las alojadas en corrales individuales dentro de edificios, en la CLALA la

mayor frecuencia fue en las alojadas en corrales individuales al aire libre. Sin duda deben existir otras variables confusoras que intervienen, tales como manejo, higiene o condiciones climáticas, entre otras, las cuales requieren ser evaluadas con mayor detalle.

En un estudio realizado en diversas granjas ovinas en Holanda, mediante un análisis multivariado se pudo comprobar que el envío de los animales a ferias ganaderas, la adquisición de pie de cría o de sementales, la dificultad para alojar los animales dentro de edificios y el incremento en el tamaño del rebaño, fueron los factores asociados con el riesgo de neumonía estival (Dercksen *et al.*, 1996).

Algo similar a lo que aconteció con el alojamiento, se presentó en los resultados relacionados con tratamiento antimicrobiano o empleo de vacunas contra enfermedades del tracto respiratorio. Con excepción del CAIT en el cual la RM (1.52 [1.01 – 2.20]) nos indica una ligera ventaja de los vacunados contra la pasteurellosis neumónica sobre los no vacunados, con respecto al aislamiento de Mh, no hubo diferencias significativas ni consistencia suficiente en los datos que permitieran hacer comparaciones y llegar a conclusiones válidas.

Como ya se ha mencionado, la serotipificación no es un método suficientemente confiable para la identificación específica del género *Mannheimia*, razón por la cual se hace énfasis en la genotipificación para una apropiada identificación de las diferentes especies de Mh.

Los 12 serotipos de Mh difieren en su estructura genómica así como en sus antígenos de superficie y otros componentes bacterianos (Highlander, 2001). La secuenciación del ARNr ha demostrado que los serotipos 1, 2 y 11 representan grupos distintos dentro del género *Mannheimia* (Davies *et al.*, 1996) y que los serotipos 1, 5-9, 12, 13, 14 y 16 poseen idénticas secuencias ARNr, mientras que el S2 difiere en dos posiciones de la secuencia; el análisis genético del serotipo 17 todavía no se reporta, no obstante las bases genéticas de la variación clonal entre los serotipos de Mh aún no han sido estudiados (Highlander, 2001).

En México la mayoría de los estudios sobre Mh se han enfocado a su caracterización fenotípica, lo cual ha permitido conocer la presencia y distribución de los diferentes serotipos según especie, fin zootécnico y regiones del país. En este estudio fue posible confirmar la caracterización fenotípica de aislamientos de Mh, obtenidos de exudado nasal y de pulmones neumónicos de bovinos, mediante la ribotipificación, logrando así su caracterización genotípica.

De esta manera, los resultados de la ribotipificación sugieren que la mayoría de los aislamientos S1, S6 y Mg del CAIT y S1 de la CLALA, fueron genéticamente indistinguibles, ya que dentro de los clusters correspondientes compartieron el mismo Rt con el mismo número de bandas. Tanto en el CAIT como en la CLALA, la mayoría de los aislamientos S1 fueron agrupados en el Rt1 en un cluster casi homogéneo, de forma similar, la mayoría de los aislamientos del S6 y Mg del CAIT fueron agrupados en el Rt6 y el Rt10, respectivamente. En consecuencia, es posible considerar que epidemiológicamente, estos aislamientos corresponden a una misma cepa dentro de cada uno de los cluster que agrupan al S1, S6 y Mg.

No obstante el amplio número de Rt identificados en este estudio, sólo fue posible observar múltiples Rt que correspondieron a un mismo serotipo, lo que coincide con otros estudios (Murphy *et al.*, 1993; Chaslus-Dancla *et al.*, 1996; DeRosa *et al.*, 2000) pero no Rt que correspondieran a más de un serotipo lo cual ha sido reportado en un estudio previo (Snipes *et al.*, 1992). Según Snipes *et al.*, (1989), estos aislamientos del mismo serotipo pero de diferente Rt pueden ser cepas con diferente genotipo que posean porciones de sus genomas que codifiquen en la producción de ciertos antígenos similares que les permiten compartir el serotipo, pero que tienen otras porciones significativas del genoma que son diferentes, lo cual podría indicar una variación en los genes entre los operones rRNA, ya que estos son altamente conservados y no son sujetos de mutaciones frecuentes.

Aún cuando unos pocos aislamientos de diferentes serotipos y ribotipos se agruparon en un mismo cluster, los resultados de la ribotipificación muestran un acuerdo parcial con los de la identificación fenotípica preliminar, ya que agrupan dentro de clusters separados con más de 90% de similitud, a la mayoría de los aislamientos del S1, S6 y Mg. Esto es muy similar a un estudio previo en donde se reporta un total acuerdo entre los resultados de la ribotipificación y la fenotipificación previa de cepas de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like. Angen *et al.*, (2002).

En coincidencia con otros estudios (Chaslus-Dancla *et al.*, 1996; Kodjo *et al.*, 1999; Blackall *et al.*, 2001; Angen *et al.*, 2002), en este la enzima de restricción *HindIII* demostró ser de gran utilidad en la ribotipificación de los aislamientos de *Mannheimia* spp., en contraste con lo reportado por Murphy *et al.*, (1993) que no pudo identificar ribotipos diferentes entre aislamientos de Mh S1; quizá debido a que en dicho estudio solo se estudiaron 22 aislamientos de una misma granja, mientras que en este trabajo fueron 106 aislamientos de diferentes granjas y áreas geográficas, lo cual implica una mayor heterogeneidad genética.

La ribotipificación ha demostrado ser una herramienta útil para la clasificación y agrupación de diversas bacterias, incluyendo la familia *Pasteurellaceae* (Blackall *et al.*, 2001), aún cuando se ha cuestionado su validez para calcular la distancia taxonómica entre cepas (Saxena *et al.*, 2005), se pudo demostrar la correlación entre clusters por ribotipos y clusters mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE, por sus siglas en inglés) tanto de *P. multocida* como de Mh (Angen *et al.*, 1997; Blackall *et al.*, 1998), así como entre cluster con MLEE y la determinación de la homología del ADN mediante hibridación ADN:ADN de diversas bacterias (Ochman *et al.*, 1983; Gilmour *et al.*, 1987).

Nuestros resultados corroboran que la ribotipificación es una técnica confiable para clasificar e identificar cepas del complejo *Mannheimia* (Angen *et al.*, 1997) y que en

combinación con la serotipificación mediante la HAI, es útil para la caracterización de aislamientos de *Mannheimia* spp. en estudios epidemiológicos.

La caracterización genotípica de las cepas analizadas en este estudio muestra que la mayoría de ellas se agrupan dentro un mismo Rt (Rt1) conformando un solo cluster, independientemente del origen de las mismas, e indica que todas las cepas hacen parte del complejo [P] *haemolytica* negativo a la trehalosa, que fue reclasificado en el género *Mannheimia*.

La identificación de los serotipos prevalentes así como de la variabilidad genética de las cepas aisladas, serán de gran utilidad para entender la epidemiología de la enfermedad y de posibles brotes ocasionados por dichas cepas, para el monitoreo serológico de hatos o regiones infectadas, para el desarrollo y preparación de inmunógenos para el control de la enfermedad, y además, contribuye a identificar posibles causas de las fallas en el empleo de vacunas. Adicionalmente, contribuyen a identificar asociaciones a través de las cuales se podrán determinar posibles factores de riesgo asociados a la frecuencia y distribución del complejo respiratorio bovino.

## **CAPÍTULO VIII**

### **Conclusiones**

## Conclusiones

Con base en el análisis de los resultados obtenidos podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Este es el primer estudio hecho con una muestra representativa de la población de referencia, lo cual ha permitido conocer las TPA en las muestras estudiadas e inferir sobre las TPV en las poblaciones de referencia.
2. Las diferencias entre las TPA del CAIT y de la CLALA en los CSN y en los CEN fueron significativas.
3. Se corrobora que las frecuencias de aislamiento de Mh son mayores en los bovinos CEN y en los menores de un año de edad, y que dichos grupos fueron consistentemente los más expuestos a este tipo de aislamientos en ambas cuencas.
4. Las diferencias entre las frecuencias de aislamientos de los diferentes serotipos de Mh en los bovinos CSN y los CEN, en el CAIT y la CLALA, y en entre cada una de las dos cuencas fueron significativas.
5. Las diferencias entre las frecuencias de aislamientos de los diferentes serotipos de Mh en pulmones neumónicos, fueron significativas en el RMGP y al comparar los dos rastros.
6. Los aislamientos de Mh constituyen la colección más representativa de cepas del complejo *Mannheimia* de origen bovino existente en el país.
7. El aislamiento del serotipo A11, constituye el primer aislamiento de *M. glucosida* en exudado nasal y en pulmones neumónicos de bovinos en México.
8. Genotípicamente la mayoría de las cepas aisladas se agruparon dentro de un mismo ribotipo (Rt1) y conformaron un solo cluster, independientemente del origen de las mismas, y todas hacen parte del género *Mannheimia*.
9. Finalmente, mediante los resultados de esta investigación fue posible alcanzar los objetivos propuestos y comprobar las hipótesis respecto a las diferencias en las prevalencias

y las frecuencias de los serotipos y genotipos de los aislamientos de *Mannheimia* spp., obtenidos tanto en exudado como en pulmones neumónicos, en los dos complejos lecheros sujeto de estudio.



## **CAPÍTULO IX**

### **Perspectivas de la Investigación**

### **Perspectivas de la investigación**

Para los propósitos de la presente tesis, y como se describe en los capítulos III, IV y V, se llevó a cabo la fenotipificación a un total de 366 aislamientos de *Mannheimia* spp. obtenidos de exudado nasal en el CAIT y la CLALA, y de pulmones neumónicos de bovinos del RMTL y el RMGP, además de cepas de referencia de *M. haemolytica* (Cuadro 1); a todos ellos se les realizó la extracción del ADN cromosómico y de los 366 aislamientos de campo se seleccionaron 122 que habían sido identificados en alguno de los serotipos de Mh (S1 y S6) y los de Mg obtenidos de exudado nasal (CAIT y CLALA), a los que se les realizó la ribotipificación, lo cual se describe en el capítulo VI.

De igual manera y como parte fundamental de la investigación, también se realizó la digestión con *Hind*II del ADN de los aislamientos restantes de Mh y de Mg obtenidos de pulmones neumónicos (RMTL y RMGP), además de los no tipificables (NT) obtenidos tanto de exudado nasal (CAIT y CLALA) como de pulmones neumónicos (RMTL y RMGP) (Cuadros 2 y 3), en algunos de los cuales se llevó a cabo la ribotipificación. Como es evidente esta parte de la investigación se continúa y está en las etapas finales, por lo que sólo se tienen resultados parciales, los cuales se describen en las figuras 1 – 4. Una vez que se tenga la caracterización de todos estos aislamientos a través de los ribotipos identificados será posible elaborar los dendrogramas correspondientes, y de esa manera conocer los porcentajes de similitud entre las cepas. Estos resultados serán publicados en sendos artículos científicos.

Como ya se ha mencionado, este cepario constituye el más grande existente en el país y como tal constituye un fuente riquísima para el desarrollo de investigaciones subsecuentes, teniendo en cuenta que todavía quedan muchos enigmas sobre Mh ya que el conocimiento sobre su metabolismo, patogénesis y virulencia sigue siendo limitado, no sólo por la gran

variabilidad genética, señalada por diversos autores, sino por las dificultades que se presentan en la manipulación genética de este microorganismo.

El hecho de que ya haya sido secuenciado su genoma (Giogia *et al.*, 2006), sin lugar a dudas será una fuente de conocimientos adicionales sobre su metabolismo, patogénesis y virulencia, pues ha puesto al descubierto algunas características de gran interés, las cuales incluyen, entre otras, bacteriófagos, genes relacionados con la competencia natural, con la regulación transcripcional y con la virulencia, algunos de estos ya conocidos con anterioridad.

En el caso del cepario existente, creemos que deberá avanzarse en el conocimiento sobre el comportamiento de los aislamientos de Mh y de Mg, en cuanto a su expresión en factores de patogenicidad y virulencia, tales como Lkt, PME, adhesinas, resistencia a antimicrobianos, plásmidos, entre otros. De hecho, en el ADN de un alto porcentaje de las cepas estudiadas (datos no mostrados) fue posible identificar plásmidos de alto y bajo peso molecular, algo significativo dado que, como ya lo hemos mencionado, Mh posee varios de ellos asociados a la resistencia de diversos quimioterapéuticos. En este sentido, y como parte del proyecto en el que se llevó a cabo esta tesis, se vienen desarrollando algunas tesis de licenciatura y de maestría relacionadas con el estudio de la resistencia antimicrobiana.

Cuadro 1. Total de extracciones de ADN cepas de *Mannheimia* spp. de referencia y de campo, según su origen.

Origen	No. Cepas
Referencia	12
CAIT	187
CLALA	127
RMTL	37
RMGP	15
Total	378

Cuadro 2. Total de cepas de *Mannheimia* spp. cuyo ADN fue digerido con enzima de restricción *HindIII*, según su origen y serotipo.

Serotipo	Origen(*)				Total
	CAIT	CLALA	RMTL	RMGP	
A1	49	61	13	4	127
A6	9	3	9	0	21
A11	6	0	0	1	7
Total	64	64	22	5	155

Cuadro 3. Total de cepas no titificables (NT) de *Mannheimia* spp. cuyo ADN fue digerido con enzima de restricción *HindIII*, según su origen.

Origen*	Total	%	Digeridas	%
CAIT	123	58	71	57.7
CLALA	62	30	19	30.6
RMTL	15	7	15	100
RMGP	10	5	10	100
Total	210	100	115	54.7

CAIT: Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca

CLALA: Cuenca Lechera de La Laguna

RMTL: Rastro Municipal de Tlalnepantla

RMGP: Rastro Municipal de Gómez Palacio

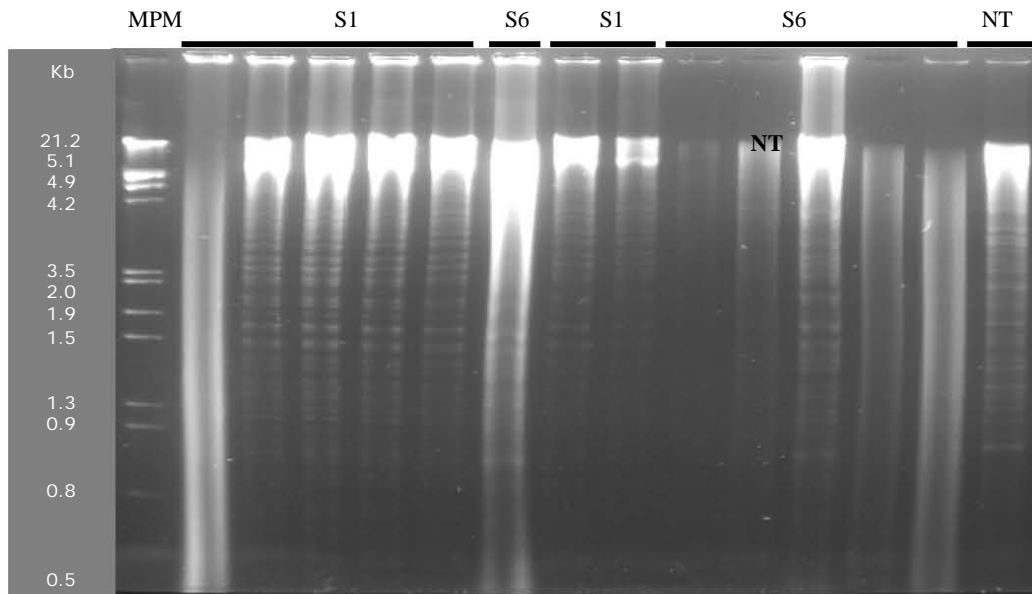


Figura 1. Gel de agarosa al 1% (TBE 0.5x + bromuro de etidio) donde se observa la digestión con *Hind*III de ADN cromosómico de cepas de *M. haemolytica* S1, S6 y NT obtenidas de pulmón neumónico de bovinos, y el marcador de peso molecular (MPM) (DNA MWM- III [Roche®]).

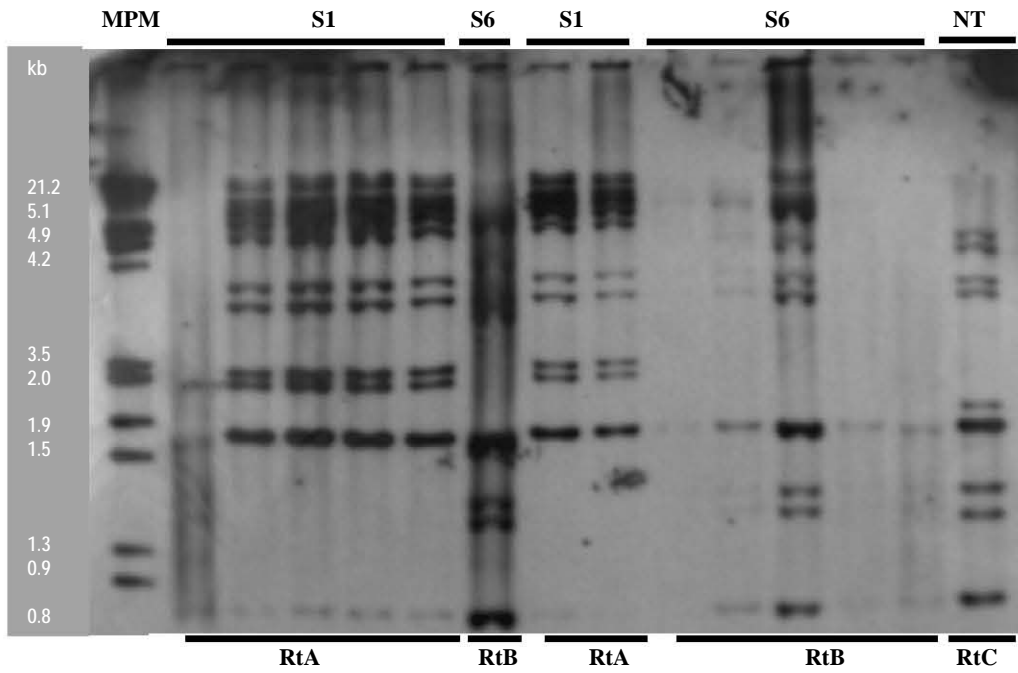


Figura 2. Autoradiografía representativa de un Southern blot donde se observan los ribotipos (Rt) obtenidos en el ADN cromosómico de cepas de *M. haemolytica* S1, S6 y NT obtenidas de pulmón neumónico de bovinos, y el marcador de peso molecular (MPM) (DNA MWM-III [Roche®]). Se identifican tres Rt diferentes: para S1 el RtA, para el S6 el RtB y para las NT el RtC.



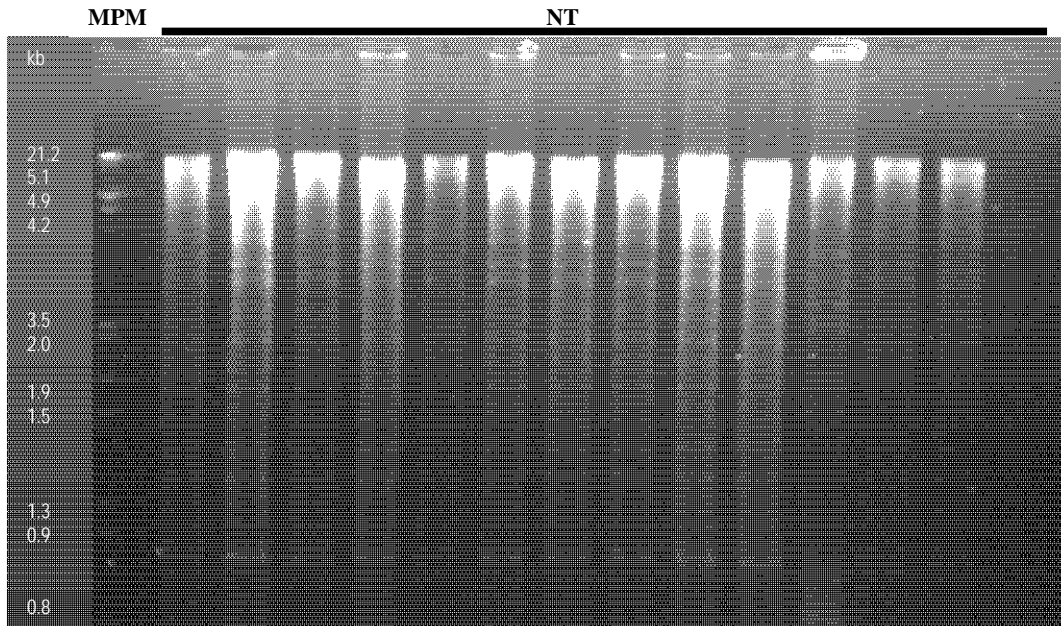


Figura 3. Gel de agarosa al 1% (TBE 0.5x + bromuro de etidio) donde se observa la digestión con *Hind*III de ADN cromosómico de cepas de *M. haemolytica* NT obtenidas de exudado nasal, y el marcador de peso molecular (MPM) (DNA MWM- III [Roche®]).

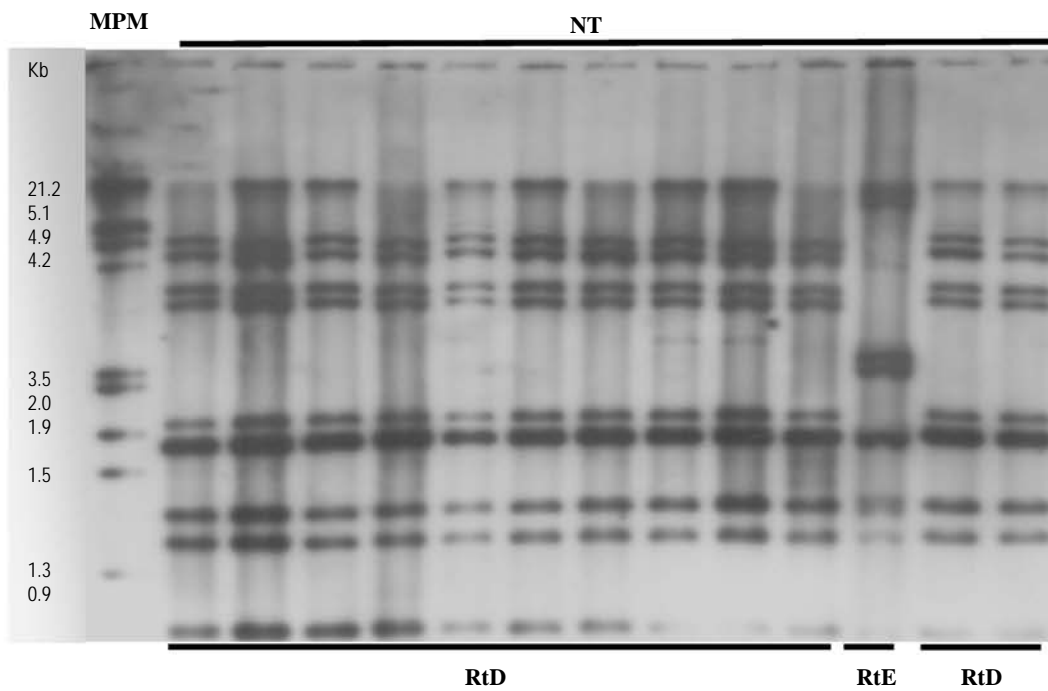


Figura 4. Autoradiografía representativa de un Southern blot donde se observan los ribotipos (Rt) obtenidos en el ADN cromosómico de cepas de *M. haemolytica* no tipificables (NT) obtenidas de exudado nasal de bovinos, y el marcador de peso molecular (MPM) (DNA MWM-III [Roche®]). Se identifican dos Rt diferentes D y E.

## Referencias

Al-Ghamdi GM, Ames TR, Baker JC, Walker R, Chase CC, Frank GH, Maheswaran SK. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. J Vet Diagn Invest 2000; 12(6): 576-8.

Anderson AM., Whitlock JE. Harwood VJ., 2006. Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle and horses. Appl Environ Microbiol 72 (11): 6914-6922.

Angen O, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Genotypic relationships among strains classified under the (*Pasteurella*) *haemolytica*-complex as indicated by ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis. Zentralb Bakteriell 1997; 286: 333-354.

Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16SrRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen., comb.nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov.. Int J Syst Bacteriol 1999a; 49: 67-86.

Angen O, Quirie M, Donachie W, Bisgaard M. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. Vet Microbiol 1999b; 65: 283-290.

Angen O, Ahrens P, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. Vet Microb 2002; 84: 103-114.

Argueta, GJ, Mercado PM, Trigo TFJ: Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Vet Méx 1988; 19: 93-97.

Biberstein EL. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Berges and Norris JR. Methods in Microbiology. Acade. Press Inc. N.Y.10: 253-269, 1978.

Blanco VFJ, Trigo TFJ, Jaramillo ML, Aguilar RF, Tapia PG, Suarez GF: Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet Méx 1993; 24(2): 107-112.

Blanco-Viera FJ, Trigo FJ, Jaramillo-Meza L, Aguilar-Romero F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from México. Rev Lat-Amer Microbiol 1995; 37: 121-126.

Blackall PJ, Fegan N, Chew GTI, Hampson DJ. Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. Microbiology 1998; 144: 279-289.

Blackall PJ, Angen O, Fegan N, Blackall LL, Mutters R, Bisgaard M. Characterisation of novel *Mannheimia* sp from Australian feedlot cattle. Aust Vet J 2001; 79(9): 634-639.

Blackall PJ, Bisgaard M, Stephens CP. Phenotypic characterization of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. Aust Vet J 2002; 80(1-2): 87-91.

Blumberg HM, Stephens DS, Licitra C, Pigott N, Flackman R, Swaminathan B, Wachsmuth IK. Molecular epidemiology of group Streptococcal infections: use of restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA and DNA restriction fragment length polymorphisms of ribosomal RNA genes (Ribotyping). J Infect Dis 1002; 166: 574-579.

Brosius J., Ullrich A., Raker MA., Gray A., Dull TJ., Gutell RR., Noller HF. Construction and fine mapping of recombinant plasmid containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. Plasmid 1981; 6: 112-118.

Brown TA, Southern blotting and related DNA detection techniques. Encyclopedia of Life Sciences 2001. Nature Publishing Group./www.els.net.

Burrows LL, Olah-Winfield E, Lo CR. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Infect Immun 1993; 61(12): 50001-5007.

Catry B, Baele M, Opsomer G, de Kruif A, Decostere A, Haesebrouck F. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. Vet Microbiol 2004; 98: 251-260.

Colín FR, Jaramillo L, Aguilar F, Trigo FJ, Merino MM. Serotipos de *Pasteurella hemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. Rev Lat-Amer Microbiol 1987; 29: 231-234.

Collins MT, Swanson EC. Use of the API 20E system to identify non-enterobacteriaceae from veterinary medical sources. Am J Vet Res 1981; 42(7): 1269-1273.

Cowan ST, Steel's KJ. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. México, Continental, S.A., 1979.

Chen HI, Hukten K, Clarridge JE. Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. J Clin Microbiol 2002; 40 (9): 3438-3441.

Chaslus-Dancla E, Lesage-Descauses MC, Leroy-Sétrin S, Martel JL, Courdet P, Lafont JP. Validation of random amplified polymorphic DNA assays for ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. Vet Microbiol 1996; 52: 91-102.

Davies RL, Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogenetic relationships and diversity within the *Pasteurella haemolytica* complex based on 16S rRNA sequence comparison and outer membrane protein and lipopolysaccharide analysis. Int J System Bacteriol 1996; 46(3): 736-744.

De Ley J, Mannheim W, Mutters R, Piculla K, Tytgat R, Segers P, Bisgaard M, Frederiksen W, Hinz K-H, Vanhoucke M. Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. Inter J System Bacteriol 1990; 40 (2): 126-137.

Dercksen DP, Crauwels APP, Elbers ARW. An epidemiological study into risk indicators for *Pasteurella haemolytica* related summer pneumonia in lambs in the southern Netherlands. *Vet Quarterly* 1996; 18 (3): 100-101.

DeRosa DC, Mechor GD, Staats JJ, Chengappa M, Shryock TR. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J Clin Microbiol* 2000;38 (1): 327-332.

Erasmus JA. The usefulness of the API 20E classification system in the identification of *Actinobacillus actinomycetem comitans*, *Actinobacillus seminis* and *Pasteurella haemolytica*. *Onderstepoort J Vet Res* 1983; 50: 97-99.

Fodor L, Varga J. Characterisation of a new serotype of *P haemolytica* isolated in Hungary. *Res Vet Sci* 1988; 44: 399.

Frank GH. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the Midwestern United States. *Am J Vet Res* 1982; 43(11): 2035-2037.

Frank GH, Smith PC. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am J Vet Res* 1983; 44 (6): 981-985.

Fraser J, Gilmour NJL, Laird WS. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* serotypes isolated from ovine pasteurelosis in Britain. *Vet Rec* 1982a; 110: 560-561.

Fraser J, Laird S, Gilmour NJL. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci* 1982b; 32: 127-128.

Gilmour MN, Whittam TS, Kilian M, Selander RK Genetic relationship among oral streptococci. *J Bacteriol* 1987; 169: 5247-5257.

Gioia J, Qin X, Jiang H, Clinkenbeard K, Lo R, Liu Y, Fox GE, Yerrapragada S, McLeod MP, McNeill TZ, Hemphill L, Sodergren E, Wang Q, Wang Q, Muzny DM, Homsy FJ, Weinstock GM, Highlander SK. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: Insights into virulence, natural competence, and *Pasteurellaceae* phylogeny. *J Bacteriol* 2006; 188 (20): 7257-7266.

González R C. Perfil serológico contra antígenos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en corderos clínicamente enfermos de neumonía y desafiados experimentalmente (tesis de maestría). México (D.F) México: Univ Nacional Autónoma de México, 2002.

Grimont F, Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gen restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Ints Pasteur Microbiol* 1986; 137B: 165-175.

Hazirolu RF, Erdeger J, Gulbahar MY, Kul O. Association of *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* with pneumonia in calves. *Dtsch tierarztl Wschr* 1997; 104: 125-164.

Highlander SK. Molecular genetic análisis of virulence in *Mannheimia*. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6: 1128-1150.

Jaramillo ML, Aguilar RF, Trigo TFJ. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos en becerros en México. *Vet Méx* 1987; 18: 185-188.

Katsuda K, Kamiyama M, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Eguchi M. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. *Vet J* 2007; (Article in press).

Kirkan S and Kaya O. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* strains pneumonic lungs of sheep in the Aydin Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29: 491-494.

Kodjo A., Villard L., Bizet Ch., Martel JL., Sanchis R., Borges E., Gauthier D., Maurin F., Richard Y. Pulse-Field Electrophoresis is more efficient than Ribotyping and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (2): 380-385.

Lo RYC. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 2001; 83: 23-35.

Magliano D, Lee W, Choo A. Nucleic Acid: Hybridization. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001. Nature Publishing Group./www.els.net

Martín SW, Meek AH, Willeberg P. *Epidemiología veterinaria. Principios y métodos*. España: Acribia, 1997.

Maslow JN, Mulligan ME. Molecular Epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 153-64.

Murphy GL, Robinson LC, Burrows GE. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *Clin Microbiol* 1993; 31 (9): 2303-2308.

Mutters R, Ihm P, Pohl S, Frederiksen W, Mannheim W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Inter J System Bacteriol* 1985; 35 (3): 309-322.

Moustafa AM. *Pasteurella haemolytica* A2 infection in two sheep flocks in Tripoli area (Libya). *Revue Élev Méd vét Pays Trop* 1994; 47(3): 289-290.

Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 2002; 84: 337-356.

Ochman H, Whittam TS, Caugant DA, Selander RK. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Gen Microbiol* 1983; 129: 2715-2726.

Pandher K, Murphy GL, Confer AW. Identification of immunogenic, surface-exposed outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotipo 1. *Vet Microbiol* 1999; 65 (3): 215-226.

Pijoan AP, Chávez DJA. Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet Méx* 2003; 34(4): 333-342.

Pijoan P, Aguilar RF, Morales AF. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet Méx* 1999; 30(2): 149-155.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A. and Owen, R.J. (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8, 151–158.

Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe Publishing, 1994.

Rowe HA, Poxton IR, Donachie W. Survival of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* inn tracheobronquial washings of sheep and cattle. *Vet Microbiol* 2001; 81: 305-314.

Saxena MK., Kumar AA., Chaudhari P., Shivachandra SB., Singh VP., Sharma B Ribotyping of Indian isolates of *Pasteurella multocida* based on 16S and 23S rRNA genes. *Vet Res Commun* 2005; 29: 527-535.

Segura JC, Honhold N. *Métodods de muestreo para la producción y la salud animal*. México: Universidad Autónoma de Yucatán, 2000.

Sisay T, Zerihun A. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the Highlands of Wollo, North East Ethiopia. *Vet Res Commun* 2003; 27(1): 3-14.

Snipes KP., Hirsh DC., Kasten RW., Hansen LM., Hird DW., Carpenter TE., McCapes RH. Use of an rRNA probe and Restriction Endonuclease Analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (8): 1847-1853.

Snipes KP., Kasten RW., Wild MA., Miller MW., Jessup DA., Silflow RL., Foreyt WJ., Carpenter TE. Using ribosomal RNA gene restriction patterns in distinguishing isolates of *Pasteurella haemolytica* from bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *J Wildlife Dis* 1992; 28 (3): 347-354.

Trigo TFJ: Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Vet Méx* 1991; XXII(2): 131-134.

Trigo FJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos. *Memorias del Seminario de Pasteurelosis Neumónica del Ganado Bovino*; 1995; Monterrey, N.L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, 1995: 18-22.

Versalovic J, Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol* 2002; 10(10): 15-21.

Wray BC, Thompson DA. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. Br Vet 1971; 127: lxvi-lxvii.

Zanabria V, Rivera GH, Rosadio AR. Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. Rev Inv Vet Perú 2000; 11(12): 169-187.

Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005; 36: 133-156.