

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Pasteurella multocida* DE
ORIGEN BOVINO, MEDIANTE LA DETECCIÓN DE LOS GENES
hyaD-hyaC Y *dcbF* DEL OPERÓN CAPSULAR

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ALMA DELIA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

Asesores:

Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango
Dr. Rigoberto Hernández Castro

México, D. F.

2008



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.

DEDICATORIA

A mis padres, Silvia, Paco, Lydia y Rogelio.

A mis hermanos, Paco, Miguel, Erika, Iván y Uriel.

A mis abuelos, Luz, Ricardo, Maye y Santos.

A mi tía, Lic. Marta González Colín.

A mis amigos incondicionales, Javier y Emilio.

Doy las gracias a cada uno de ustedes, aunque sé que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, la confianza, los consejos, el amor, estímulo y aliento en todos estos años, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una instrucción de calidad.

Con cariño y admiración.

AGRADECIMIENTOS

Como un testimonio de cariño y eterno agradecimiento a mis asesores, Rigoberto Hernández Castro y Carlos Julio Jaramillo Arango, por su paciencia, confianza, orientación, consejos y estímulos brindados, ese camino que inicio con toda la responsabilidad que representa el término de mi carrera profesional.

Al Mvz Msc Arturo Federico Olguín y Bernal, porque de no haber sido por él, no hubiese tenido el privilegio de formar parte de este equipo de trabajo.

Al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y al Departamento de Microbiología e Inmunología.

A mis compañeros de equipo y amigos Víctor Manuel, María Luisa y Valeria.

A los integrantes del laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis, Lucy, Yuli, Rosalia, Erika, Olga, Gaby, Yanela, Alexis, Dra. Irasema, Dra. Bety, Dr. José Ángel, Elihú, Uziel, Jorge Alba y Jorge, por haberme orientado, brindarme su apoyo y amistad.

A Julio Lejarazo Guerrero por haberme esperado tanto tiempo y tan tarde.

A Rodolfo Camacho Velázquez por soportarme hasta el borde de un colapso nervioso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (PAPIIT) por el financiamiento de esta tesis a través de los proyectos CONACyT G38590-B y PAPIIT IN208708.

A los miembros del jurado de mi tesis, José Ignacio Sánchez Gómez, Rosa Elena Miranda Morales, Inda Marcela Figueroa Ochoa y José Juan Martínez Maya, por sus ideas, sugerencias y comentarios para mejorar este trabajo.

Reitero mi más sincera gratitud a todas las personas que han participado de alguna u otra forma para que hoy este aquí.

Por lo que ha sido y será.....Gracias.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS.....	32

Palabras clave: *P. multocida*, serogrupo A, serogrupo D, PCR múltiple, complejo lechero de la Región Lagunera en México.

RESUMEN

GONZÁLEZ RODRÍGUEZ ALMA DELIA. Identificación molecular de *Pasteurella multocida* de origen bovino, mediante la detección de los genes *hyaD-hyaC* y *dcbF* del operón capsular, (Bajo la dirección del Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango y Dr. Rigoberto Hernández Castro).

Las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia en las neumonías bovinas son *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus sommi*, sin embargo, en Estados Unidos se ha reportado una reducción en el porcentaje de aislamiento de *M. haemolytica* y un aumento en el aislamiento de *P. multocida* en los últimos 8 años, por lo cual resulta importante contar con una técnica de identificación adecuada. Las técnicas de tipificación de los serogrupos A y D de *P. multocida* se realizan mediante la identificación bioquímica y fenotípica, que requiere hasta dos semanas para obtener el resultado definitivo, por lo que se propone la técnica de PCR múltiple como un método de diagnóstico sensible, específico, rápido y confiable. Fueron identificadas 169 cepas de *P. multocida* obtenidas de exudados nasales de bovinos clínicamente sanos y clínicamente enfermos de neumonía provenientes de un complejo lechero de la Región Lagunera en México. Los aislamientos fueron identificados mediante el sistema API20NE; mediante la técnica de hialuronidasa se identificaron las cepas del serogrupo A (95.26%), el serogrupo D fue identificado por medio de la técnica de acriflavina (4.74%). Se llevó a cabo la tipificación molecular con la técnica de PCR múltiple identificando al serogrupo A con una frecuencia del 88.16% y al serogrupo D con el 11.84%. La PCR múltiple fue capaz de detectar 12 cepas pertenecientes al serogrupo D y que habían sido identificadas como serogrupo A mediante las técnicas convencionales de hialuronidasa y acriflavina. Por lo tanto, la PCR múltiple fue más rápida y específica, por lo que se sugiere como técnica de tipificación para este microorganismo.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias producen importantes pérdidas económicas en las explotaciones de bovinos alrededor del mundo, se estima que tan solo en Estados Unidos de Norte América y Canadá las pérdidas a causa de las neumonías ascienden a poco más de un billón de dólares anuales y representan el 30 % de la mortalidad en bovinos.^{1, 2}

Aunque en México se conoce poco sobre el impacto económico que se produce por las neumonías en bovinos, tal repercusión es preocupante no sólo por las tasas de mortalidad y morbilidad que ocasionan, sino también por las pérdidas que se derivan en el retraso del crecimiento y los gastos implícitos en los tratamientos veterinarios, los cuales involucran desde los honorarios del médico veterinario zootecnista, hasta la compra de medicamentos y vacunas. En el peor de los casos los animales mueren antes de alcanzar el peso para salir al mercado.³ Uno de los problemas más importantes que inciden directamente en la rentabilidad ganadera de las explotaciones es la mortalidad neonatal. Pijoan y Chávez (2003) en Tijuana, Baja California concluyeron que los costos directos por este problema van desde los 83.25 a los 501.41 pesos por becerro de reemplazo, y los costos indirectos van de los 235.12 a los 301.07 pesos. También se ha revelado que en la zona norte del país el 25% de las muertes en bovinos se atribuyen a esta enfermedad, lo que representa una gran pérdida económica para los productores.

4

La etiología de las neumonías es variada y es reconocido que la pasteurelisis neumónica bovina (también conocida como fiebre de embarque) es la enfermedad

de mayor significancia dentro de los procesos neumónicos, representa el 75% de las neumonías.⁶

La pasteurelosis neumónica bovina es un proceso neumónico fibrinoso agudo, del cual comúnmente se aíslan microorganismos como *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*.⁵

La etiología de la pasteurelosis neumónica bovina es multifactorial con la participación de diversos factores de riesgo que determinan la presentación y severidad de las lesiones neumónicas entre los que destacan aquellos relacionados con el manejo y que generan estrés; así como la participación de otros agentes infecciosos de origen bacteriano y particularmente agentes primarios de tipo viral^{1, 5, 6}

Entre los factores ambientales se encuentra el hacinamiento o mezcla de animales de diferentes edades, calor o frío excesivo, elevada humedad relativa, cambios bruscos de alimentación, estrés por transportación prolongada y fatiga. Al presentarse dichos factores por periodos de tiempo prolongado, conducen a la hipersecreción de corticosteroides que comprometen la respuesta del hospedador a los agentes infecciosos. Esto es a causa de la inhibición en la liberación de factores quimiotácticos por parte de los macrófagos alveolares, los cuales representan una defensa inmunológica, complementado con un bloqueo en la unión de factores quimiotácticos a los granulocitos e inhibiendo la capacidad de migración del macrófago alveolar.⁵

Los agentes infecciosos aislados con mayor frecuencia son el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), virus de la parainfluenza 3 (virus PI₃), virus respiratorio sincitial (virus RS) y adenovirus entre otros; entre los agentes bacterianos sobresalen *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, pudiéndose presentar *Mycoplasma* spp, *Histophilus somni*, *Streptococcus* spp y *Chlamydomphila* spp, los cuales participan como agentes primarios o secundarios al interactuar con los factores ambientales y fisiológicos antes mencionados.^{5, 7, 8, 9}

La lesión pulmonar producida por *Pasteurella* se inicia a nivel del bronquio, la difusión de la infección ocurre principalmente a través del tejido conjuntivo que rodea bronquios, vasos sanguíneos y linfáticos, así como por los septos interlobulillares.^{5, 6, 9, 10} La proliferación bacteriana en el pulmón se debe a anomalías en la inactivación intracelular de bacterias por parte de los macrófagos alveolares.¹⁰ Los procesos respiratorios en los que se encuentra implicada *P. multocida* están caracterizados por depresión, anorexia e hipertermia (>40° C). Frecuentemente se observa tos, disnea y flujo óculo nasal seroso a purulento.⁶

Los periodos de incubación varían de 2 hasta 14 días¹⁰ y los animales con signos severos por lo general mueren en los primeros 25 días del arribo a la engorda, algunos pueden recuperarse en una semana o desarrollar un proceso crónico. La morbilidad fluctúa del 5 al 40%; mientras que la mortalidad varía del 5 al 25%.⁵

ANTECEDENTES

En 1880, Luis Pasteur aisló y caracterizó morfológica y bioquímicamente por primera vez a *Pasteurella multocida* a partir de sangre de aves. En 1885, Kit aisló el microorganismo de la sangre de ganado enfermo y lo llamó *Bacterium bipolare multocidum*. Hueppe, en 1886, le denominó *Bacterium septicemia haemorrhagica* y empleó el término “septicemia hemorrágica” para describir la enfermedad causada por esta bacteria en los animales. En trabajos sucesivos se observaron propiedades bioquímicas y morfológicas comunes entre las bacterias no hemolíticas que causaban septicemia por lo cual fue reagrupada como *Pasteurella multocida* en 1939. El nombre de familia *Pasteurellaceae* fue publicado por primera vez por Pohl en 1979 y su publicación fue validada en 1981.^{11, 12}

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Pasteurella multocida forma parte de la familia *Pasteurellaceae*, es una bacteria con forma de cocobacilo, Gram negativa, capsulada e inmóvil. Mide de 0.2 a 0.4 µm de ancho por 0.4 a 2.0 µm de largo, es anaerobia facultativa, con capacidad de reducir los nitritos y fermentar los carbohidratos. *P. multocida* se caracteriza por producir catalasa, citocromo oxidasa e indol; es ureasa negativa y no produce hemólisis, crece bien en medios de agar sangre, agar chocolate, Müeller-Hinton y caldo infusión cerebro corazón, pero no en agar MacConkey, eosina azul de metileno (EMB), ni en otros medios selectivos o diferenciales empleados para el aislamiento de enterobacterias; el crecimiento en agar sangre y la característica tinción bipolar ayudan a diferenciar a *P. multocida* de *Histophilus*, género con el que pudiera confundirse en la observación microscópica inicial.¹² Se divide en

cuatro subespecies de acuerdo a su capacidad de utilizar trehalosa, dulcitol y sorbitol: *P. multocida multocida*, *P. multocida tigris*, *P. multocida septica* y *P. multocida gallicida*, esta clasificación es provisional y fue propuesta por el Comité de Taxonomía del National Center for Biotechnology Information (NCBI).¹³

P. multocida se clasifica en cinco serogrupos (A, B, D, E y F) de acuerdo al antígeno capsular ^{14, 15} y 16 serotipos somáticos,¹⁶ cabe mencionar que el serogrupo C es acapsular. La mayoría de las cepas de *P. multocida* poseen una cápsula de polisacáridos,¹⁷ los cuales son compuestos de moléculas repetidas de monosacáridos ensamblados por enlaces glicosídicos. La presencia de numerosos monosacáridos y grupos hidroxilo captables para la formación de enlaces, así como la variación del número de monosacáridos, el orden, el tipo de enlace y la estructura de la rama, puede resultar en un amplio número de combinaciones.¹⁸ La composición y estructura del material capsular de los serogrupos A, D y F a base de glicosaminoglicanos es muy similar y consiste básicamente en ácido hialurónico, heparina y condroitina.^{19, 20, 21, 22}

Se ha demostrado que el material capsular de las cepas de *P. multocida* serogrupo A presenta ácido hialurónico, un polímero de ácido D-glucorónico y N-acetil-D-glucosamina ^{19, 23, 24} y algunas cepas de este serogrupo presentan un segundo polisacárido (1-4)- β -D-xilan.²⁴ El material capsular de los serogrupos D y F se ha identificado principalmente a través de la acción de mucopolisacaridasas.¹⁹ El análisis del monosacárido del serogrupo B determinó que el polisacárido capsular está compuesto de arabinosa, manosa y galactosa,^{19,}²² la composición química de la cápsula del serogrupo E permanece desconocida,

en general las cepas que poseen cápsula son más virulentas que las cepas acapsuladas.^{25, 26, 27, 28}

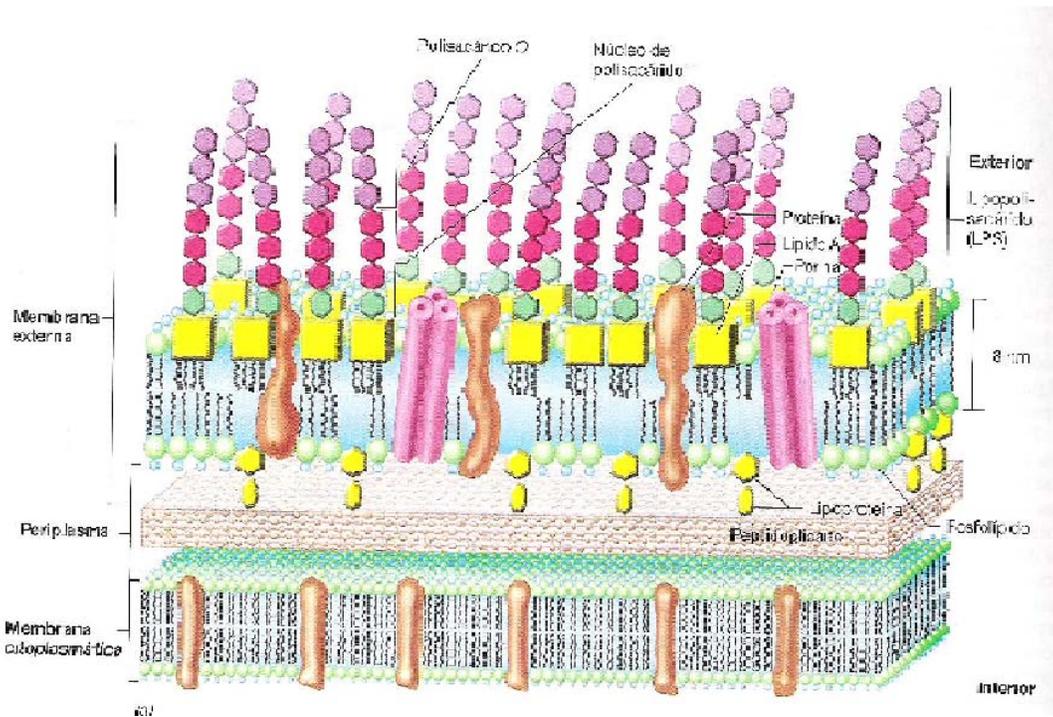


Figura 1. Pared celular Gram negativa. Disposición del lipopolisacárido, lípido A, fosfolípidos, porinas y proteínas en la membrana externa.⁵⁷

Este microorganismo tiene la capacidad de hospedarse en cualquier especie animal, debido a que forma parte de la microbiota normal del tracto respiratorio superior y del aparato digestivo de aves y mamíferos, que constituyen su principal reservorio. Las enfermedades están generalmente relacionadas al serogrupo,¹⁶ como el serogrupo A de *P. multocida* forma parte de la microbiota del tracto digestivo, así como respiratorio de aves y mamíferos domésticos y silvestres, está involucrado con el cólera aviar,^{17, 29, 30} el serogrupo D es el agente causal de la neumonía fibrinosa o fiebre de embarque en bovinos,⁵ además de la rinitis purulenta en conejos³¹ y de problemas neumónicos en ovinos, bovinos caprinos⁵.

³² y cerdos, ^{33, 34} asociado a otros género bacterianos conduce al desarrollo de rinitis atrófica en cerdos.²⁹ Mientras que los serogrupos B y E son los agentes causales de la septicemia hemorrágica de los rumiantes en Asia y África.^{7, 29, 30} El serogrupo F ha sido poco estudiado, pero se le relaciona con enfermedades que afectan a las aves.³⁵ Cabe mencionar que en México sólo se ha reportado la existencia de los serogrupos A y D.^{5, 32, 33}

GENOMA Y FACTORES DE VIRULENCIA DE *Pasteurella multocida*

El genoma de *P. multocida* ha sido objeto de estudio por muchos años, con la finalidad de obtener información sobre su replicación, factores de virulencia, huéspedes y cómo evade al sistema inmune.³⁶

Se ha reportado que la cepa de *P. multocida* Pm70 posee un cromosoma simple circular con 2 257 487 pares de bases, con 2 015 marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés), 6 operones rRNA y 57 tRNA. En este análisis se identificaron 104 genes asociados a la virulencia del microorganismo.³⁶

Los genes de virulencia codifican y regulan la actividad de los factores que están involucrados en la interacción de los patógenos con el hospedador, o bien se encuentran implícitos en los procesos metabólicos y son responsables del desarrollo de la patogénesis de la enfermedad.³⁷

Los factores de virulencia de *P. multocida* son la cápsula, endotoxina, exotoxina, proteínas captadoras de hierro, fimbria y los plásmidos de virulencia.³⁸

En bovinos los genes asociados a los factores de virulencia son *oma87*, *psl* y *ompH* que codifican para las proteínas porinas y otras proteínas de membrana externa, *ptfA* para la fimbria, *nanB* y *nanH* para neuraminidasas, *exbB-tonB*, *tbpA*, *hgbA* y *hgbB* participan en el secuestro de hierro, *toxA* para dermonecrotina, *sodA* y *sodD* para una superoxidodesmutasa y *pfhA* para una hemoaglutinina filamentosa.^{36,39}

La mayoría de cepas de *P. multocida* presentan cápsula, que es la estructura más externa de la superficie bacteriana¹⁷ y cuyas funciones son proteger a la bacteria de la deshidratación,⁴⁰ además de ser la base para la identificación de los 5 serogrupos conocidos (A, B, D, E y F), confiere adherencia a la superficie de las células del huésped, interfiere con la acción bactericida del complemento y permite determinadamente el acceso y excreción de moléculas a la membrana celular, de manera que juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad;^{17, 41} sin embargo, dicha estructura no es necesaria para la supervivencia de la bacteria.^{41,}

42

La secuencia de nucleótidos de los genes que codifican para la síntesis de la cápsula de *P. multocida* serogrupo A, fue publicada en 1998.¹⁷ la cual fue descrita con 11 ORF, nueve de ellos tienen la función de codificar proteínas para la cápsula. La organización fue descrita en tres regiones, donde la región 1 y 3 contienen los genes involucrados en la traslocación y sustitución de fosfolípidos, mientras que la región 2 está involucrada en la formación de monómeros de azúcar activados y el ensamble de los polímeros de polisacáridos.^{30, 43, 44}

De acuerdo con lo descrito por Boyce,¹⁷ el producto de los primeros cuatro genes (*hexABCD*) de la región 1 (Figura 2), se encuentra involucrado en la exportación de los polisacáridos a la superficie, que a su vez forman las proteínas que tienen similitud a las proteínas involucradas en el transporte de ATP dependiente de otros géneros bacterianos capsulados como lo son *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*.^{44, 45}

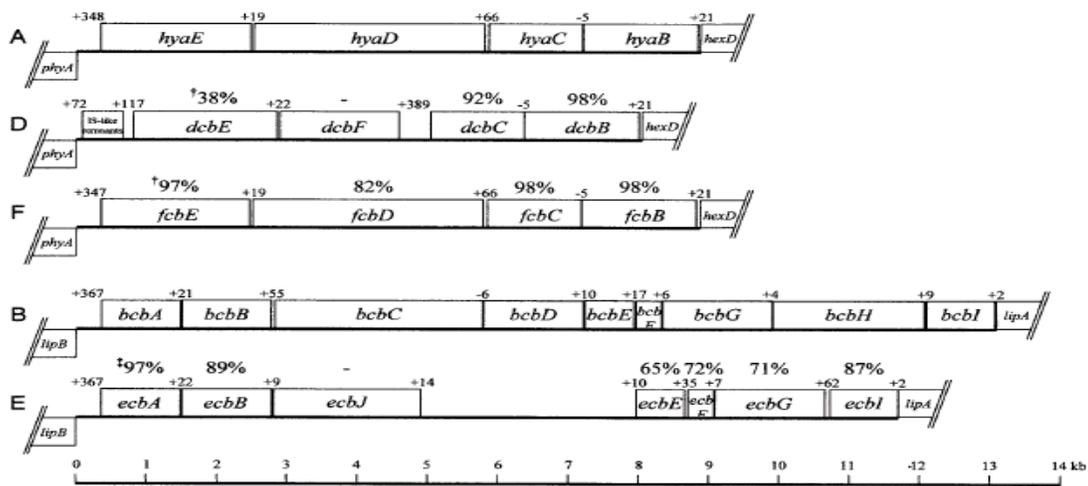


FIGURA 2. Organización genética de los diferentes serogrupos de *P. multocida*. Los números indican la distancia en pares de bases entre la última base del gen anterior y la primera base del siguiente gen.⁴³

Los productos de los cinco genes siguientes (*hyaABCDE*) de la región 2 codifican para las proteínas involucradas en la formación de los monómeros de azúcar activados y el ensamble de los polisacáridos (ácido hialurónico) del serogrupo A. Asimismo, dichos genes codifican las enzimas capaces de unir el ácido UDP glucorónico y UDP-N-acetil glicosamina, así como la polimerasa capaz de ensamblar los monosacáridos. Los genes *hyaA* y *hyaD* presentan una gran similitud y se ha propuesto que cada uno codifica para agregar los monómeros activados de azúcar para la formación de los polisacáridos. Se ha descrito que el

gen *hyaC* tiene la función de codificar una enzima semejante a la UDP-glucosa deshidrogenasa, la cual cataliza la conversión de UDP-glucosa a ácido UDP-glucorónico, el cual es un componente de la cápsula del serogrupo A. Las funciones de los genes *hyaB* y *hyaE* aún permanecen desconocidas.^{44, 45}

En la región 2 del serogrupo D se presentan cuatro genes *dcbEFCB*, con la misma orientación que los genes *hyaABCDE* del serogrupo A. El gen *dcbB* es homólogo del gen *hyaB* mientras que el gen *dcbC* es homólogo de *hyaC*, con 98 y 92% de similitud respectivamente. El producto del gen *dcbF* no presenta similitud con el gen *hyaD* del serogrupo A, sin embargo presenta una similitud del 54% a la glicosil transferasa KfiC de la cápsula de *Escherichia coli* K5. El producto de *dcbE* es similar en 56% al gen *hyaE*, *dcbE* es ligeramente más pequeño.⁴³

Los productos de los dos genes finales (*phyAB*) de la región 3 codifican para la formación de proteínas involucradas en la sustitución de fosfolípidos de ácido hialurónico anterior a la traslocación.^{44, 45}

La endotoxina o lipopolisacárido (LPS) se encuentra en la superficie de la bacteria y es la base del esquema de serotipificación, es decir de los 16 serotipos somáticos.^{16, 46} El LPS tiene una acción pirogénica, produce coagulación intravascular diseminada, activa la cascada de la coagulación, agregación de plaquetas, estimula la inmunidad humoral, activa los macrófagos e induce el factor de necrosis tumoral.⁴⁷

La exotoxina es un metabolito excretado por los serogrupos A y D de *P. multocida*, sin embargo es el serogrupo D del cual se ha reportado mayor producción de esta toxina, también conocida como dermonecrotóxina (DNT), recientemente se ha

reportado que esta DNT afecta principalmente a cerdos, pequeños rumiantes y en menor grado a bovinos y aves.^{39, 48}

La DNT tiene un efecto citotóxico en las células del pulmón de fetos bovinos y la atrofia de los huesos turbinados de cerdos, ratas, conejos y cabras.⁴⁴

Los mecanismos de defensa del huésped están basados fundamentalmente en su sistema inmunitario y la reducción de la disponibilidad de nutrientes, entre ellos el hierro. Las bacterias requieren una concentración de hierro entre 10^{-6} y 10^{-8} M para su crecimiento,⁴⁹ mientras que en las mucosas y tejidos la concentración de hierro libre es de 10^{-18} .⁵⁰ Se ha observado que *P. multocida* ha desarrollado mecanismos para secuestrar el hierro de las células del huésped mediante la liberación y síntesis de moléculas conocidas como sideróforos.³⁸

La fimbria o pili es una estructura bacteriana corta y delgada, compuesta de subunidades de proteína. Se ha observado que su papel es adherir las bacterias a la superficie del epitelio mucoso, por lo cual se considera importante para la colonización del microorganismo.³⁸

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN PARA *P. multocida*

Desde hace décadas los procedimientos para la identificación de esta bacteria se realizan con base en la morfología de colonia, afinidad tintorial y pruebas bioquímicas,¹² para la tipificación se cuenta con la técnica de hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunoelectroforesis,⁵¹ y el modelo de ratón,¹⁴ las cuales presentan dificultades ya que muchos laboratorios no disponen del antisuero o antígenos específicos para los serogrupos, además de la posibilidad de obtener una reacción cruzada con otras bacterias Gram negativas.⁵² Carter propuso dos

técnicas no serológicas para la tipificación capsular, la técnica de hialuronidasa para identificar el serogrupo A,⁵³ que se basa en la despolimerización de la cápsula del ácido hialurónico al estar en contacto con *Staphylococcus aureus* y la floculación por acriflavina⁵² para identificar el serogrupo D, técnicas que tardan de 3 a 5 días respectivamente para una identificación completa.

El desarrollo de técnicas moleculares como el análisis de ADN plasmídico, análisis con endonucleasas de restricción (REA), ribotipificación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de macrorrestricción, amplificación de fragmentos polimórficos largos (AFLP) y tipificación de secuencias multilocus (MLST) permiten detectar con claridad las variaciones genéticas entre las cepas y de esta forma facilitar su identificación.^{54, 55}

En años recientes los métodos de genotipificación han provisto grandes beneficios para la identificación bacteriana superando algunas limitaciones de los procedimientos convencionales. Los ensayos basados en la detección de los ácidos nucleicos permiten la identificación de organismos directamente de las muestras clínicas o de pequeñas cantidades de cultivos bacterianos, así se mejora considerablemente la sensibilidad y disminuye el tiempo requerido para la caracterización del microorganismo. Particularmente la PCR, ha sido muy útil, pues con el uso de iniciadores específicos resulta fácil la identificación del género, la cepa, la especie y serogrupos dominantes.⁵⁶

Con la técnica de PCR es posible producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de fragmentos de

otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de refabricar el ADN y una pequeña cadena de nucleótidos que pueda unirse a la molécula que se desea copiar o amplificar para que sirva de iniciador o “primer”.⁵⁷

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos. El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se requiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas. Cada una de estas cadenas actuará como un molde para fabricar la parte complementaria. A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada iniciador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa.^{57, 58}

Además de la reacción estándar de PCR existen una serie de modificaciones que convierten esta técnica en una de las más versátiles. Algunos ejemplos son el uso de PCR en ingeniería genética, para detección de la expresión genética (RT-PCR), PCR inversa y sus aplicaciones médicas como la detección de enfermedades producidas por patógenos o variaciones genéticas.⁵⁷

JUSTIFICACIÓN

Las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia en las neumonías bovinas son *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus sommi*, sin embargo, en Estados Unidos, se ha notado una reducción en el porcentaje de aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y un aumento en el aislamiento de *P. multocida* en los últimos 8 años,² por lo cual resulta importante contar con una técnica de identificación adecuada. Las técnicas de tipificación de los serogrupos A y D de *P. multocida* se realizan mediante la identificación bioquímica y fenotípica, además de requerir hasta dos semanas para obtener el resultado definitivo, por lo que se propone la técnica de PCR múltiple como un método de diagnóstico más sensible, específico, rápido y confiable.

HIPÓTESIS

La prueba de PCR múltiple permitirá diferenciar los serogrupos capsulares A y D de *P. multocida* de origen bovino.

OBJETIVO GENERAL

Identificar a nivel molecular cepas de *P. multocida* serogrupos A y D de aislamientos de exudado nasal de bovinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar *P. multocida* a través del sistema comercial de identificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias y no fastidiosos API 20 NE.

- Determinar los serogrupos de *Pasteurella multocida* mediante las pruebas de hialuronidasa y acriflavina.
- Identificar los serogrupos A (SA) y D (SD) de *Pasteurella multocida* mediante la determinación de los genes *hyaD-hyaC* y *dcbF* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple.
- Determinar la concordancia entre la técnica de hialuronidasa-PCR múltiple y acriflavina-PCR múltiple.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas

Se utilizaron 169 cepas de *P. multocida* aisladas de 132 exudados nasales de bovinos clínicamente sanos y de 37 clínicamente enfermos de neumonía provenientes de un complejo lechero de la Región Lagunera en México. Las cepas fueron identificadas sólo con métodos convencionales de cultivo en agar, tinción y las pruebas bioquímicas de oxidasa, TSI, indol, citrato y urea.¹²

Identificación bioquímica definitiva

Se llevó a cabo mediante el sistema API 20 NE (Analytab Products Inc, por sus siglas en inglés), el cual es un sistema estandarizado para la identificación de los bacilos Gram negativos no enterobacterias y no fastidiosos que combinan 8 ensayos convencionales, 12 ensayos de asimilación y una base de datos. La lista completa de las bacterias identificadas por el sistema está indicada en la tabla de identificación al final de una ficha mecánica que proporciona el fabricante.

La galería API 20 NE incluye 20 microtubos que contienen substratos deshidratados. Los ensayos fueron inoculados con una suspensión salina bacteriana que hidrata los medios. Las reacciones que se produjeron durante la incubación se tradujeron en cambios de color, espontáneos o provocados mediante la adición de reactivos.

Los ensayos de asimilación se inocularon con un medio mínimo y las bacterias crecieron solamente, cuando eran capaces de utilizar el correspondiente sustrato.

La lectura de estas reacciones se hizo con la ayuda de la tabla de identificación y el reconocimiento se llevó a cabo mediante el catálogo analítico o con la ayuda de un software de identificación.

Una vez transcurrido el periodo de incubación (24 horas a 29° C), se realizó la primera lectura de la galería, la segunda lectura fue realizada a las 48 horas con relación a la tabla de identificación y los resultados de las reacciones fueron anotadas en la hoja de identificación de cada cepa. Estos resultados fueron ingresados en el software APIWEB (proporcionado por el fabricante), para así determinar el género y especie bacteriana.

Tipificación capsular

Para tipificar las cepas se efectuaron las pruebas de hialuronidasa⁵³ descrita por Carter y Rundell (1973) y la prueba de acriflavina⁵² por Carter y Subronto (1975).

Para efecto de la prueba de hialuronidasa⁵³ se utilizó una placa de agar sangre con una estría de *P. multocida* y en forma transversal la cepa de *Staphylococcus aureus* cepa "Cowan", productora de la enzima hialuronidasa. Se incubó durante 18 a 24 horas a 37° C. En la identificación de *P. multocida* SA se observó la formación de una zona de inhibición de la cápsula en la región cercana a *S. aureus*. Para los controles positivo y negativo se utilizó una cepa de referencia de *P. multocida* serotipo A y una cepa de *E. coli* DH5α, respectivamente.

Para la prueba de acriflavina⁵² se colocó una colonia de *P. multocida* en un tubo con capacidad de 15 ml con 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI), incubándose a 37° C de 18 a 24 horas. Posteriormente el cultivo bacteriano se

centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y se eliminaron 2.5 ml del sobrenadante. Al cultivo restante se le agregó 0.5 ml de acriflavina neutra a una dilución de 1:1000. La lectura se realizó observando la formación de un "flóculo" en las cepas del SD. El control positivo fue una cepa de referencia de *P. multocida* serotipo D y como control negativo una cepa de la bacteria *E. coli* DH5 α .

Tipificación molecular

Para la genotipificación se realizó la técnica de PCR múltiple según el protocolo descrito por Townsend *et al.*⁴³. La extracción del ADN fue realizada colocando una asada de cultivo bacteriano en 200 μ l de agua estéril. La mezcla fue colocada a 95°C por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm por 15 min y el sobrenadante fue utilizado como template para la reacción de PCR múltiple.

Los iniciadores CAPA-FWD 5'-TGCCAAAATCGCAG-3' y CAPA-REV, 5'-TTGCCATCATTGTCAGTG-3' fueron diseñados para amplificar el segmento comprendido entre 8846 y 9873 pb del gen *hyaD-hyaC* del SA (número de acceso en GenBank AF067175), que codifica para la síntesis de ácido hialurónico y el producto de amplificación fue de 1044 pb. Asimismo, se diseñaron un juego de iniciadores CAPD-FWD 5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' y CAPD-REV 5'-CATCTACCCACTCAACCATATCAG-3' para amplificar el segmento comprendido entre la 3142 y 3766 pb del gen *dcbF* perteneciente al SD (número de acceso en GenBank AF302466), que codifica para la síntesis de glicosil transferasa de la cápsula y así amplificar un producto de 657 pb.⁴³

Cada reacción de PCR fue realizada a un volumen total de 50 µl, de los cuales 32.5 µl fueron de agua estéril, 5 µl de amortiguador 1X, 3 µl de MgCl₂ a una concentración de 50 mM, 2 µl de dNTP's 10 mM, 0.5 µl de cada uno de los 4 oligonucleótidos de la región 2 de la biosíntesis de la cápsula mencionados anteriormente, a una concentración del 10%, 5 µl del DNA y 0.5 µl de enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen, Ventura California USA). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, elongación a 56.5°C por 30 s, extensión a 72°C durante 30 s y extensión final a 72°C por 5 min.

Para la visualización de los productos amplificados se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). El tamaño del producto de amplificación para el serotipo A fue de 1,044 pb y para el serotipo D de 657 pb. En cada reacción de PCR múltiple se utilizaron cepas de referencia de *P. multocida* serotipo A y *P. multocida multocida* serotipo D, donadas por el Dr. GH Frank y el Dr. B. Briggs. NADC, USDA, y como control negativo se utilizó una cepa de *E. coli* DH5α. Las imágenes fueron fotodocumentadas en el equipo GelLogic200 (Kodak, USA).

Análisis estadístico

Con ayuda del programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados (EPIDAT) versión 3.0, Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), 2003 y con los datos obtenidos fue calculada la frecuencia del SA y SD de *P. multocida* identificados en cada uno de los grupos de bovinos sanos y enfermos, se evaluó la

concordancia absoluta y la concordancia específica entre la prueba de hialuronidasa y la PCR múltiple, así como entre la prueba de acriflavina y la PCR múltiple. Para determinar el valor de la concordancia entre las técnicas (hialuronidasa-PCR múltiple y acriflavina-PCR múltiple), se utilizó el coeficiente de Kappa.

RESULTADOS

Identificación bioquímica

De acuerdo a los valores establecidos por el sistema API 20 NE, se lograron identificar 169 cepas (100%) de *P. multocida*. De las 169 cepas analizadas, 164 (97.05%) mostraron un porcentaje de identificación del 96% y tipicidad de 1 a *P. multocida*, se observaron 5 cepas (2.95%) con resultados por debajo de lo esperado que presentaron 87.2% de identificación y 0.72 de tipicidad a *P. multocida*.

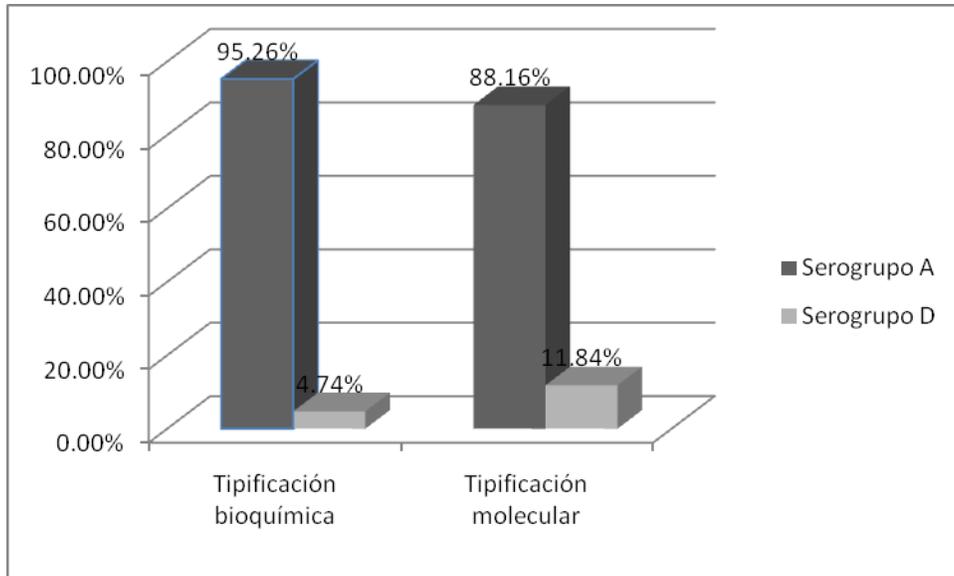
Tipificación capsular

De acuerdo a la técnica de hialuronidasa el 95.26% (161/169) de las cepas fue SA y para la prueba de acriflavina, 4.74% (8/169) fue SD (Gráfica 1).

Tipificación molecular

Mediante la prueba de PCR múltiple el 88.16% (149/169) fue SA y 11.84% (20/169) SD (Gráfica 1).

Se debe resaltar que de las cepas identificadas como SA mediante la técnica de hialuronidasa (161), la PCR múltiple detectó el 7.5% (12/161) como SD, es decir, falsas positivas.



Gráfica 1. Identificación de los serogrupos A y D de *P. multocida* obtenido por medio de las técnicas convencionales (hialuronidasa y acriflavina) y la PCR múltiple.

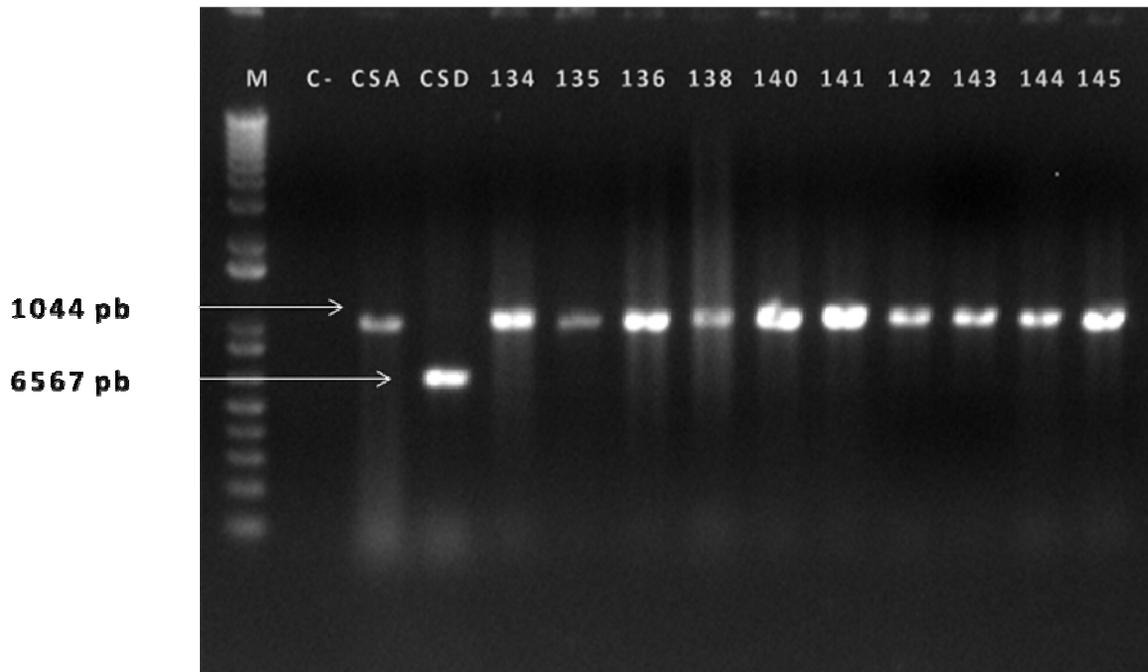


Figura 3. Producto de amplificación de PCR múltiple de las cepas de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador, C- control negativo, CSA control del serogrupo capsular A, CSD control del serogrupo capsular D, los números corresponden a las cepas estudiadas.

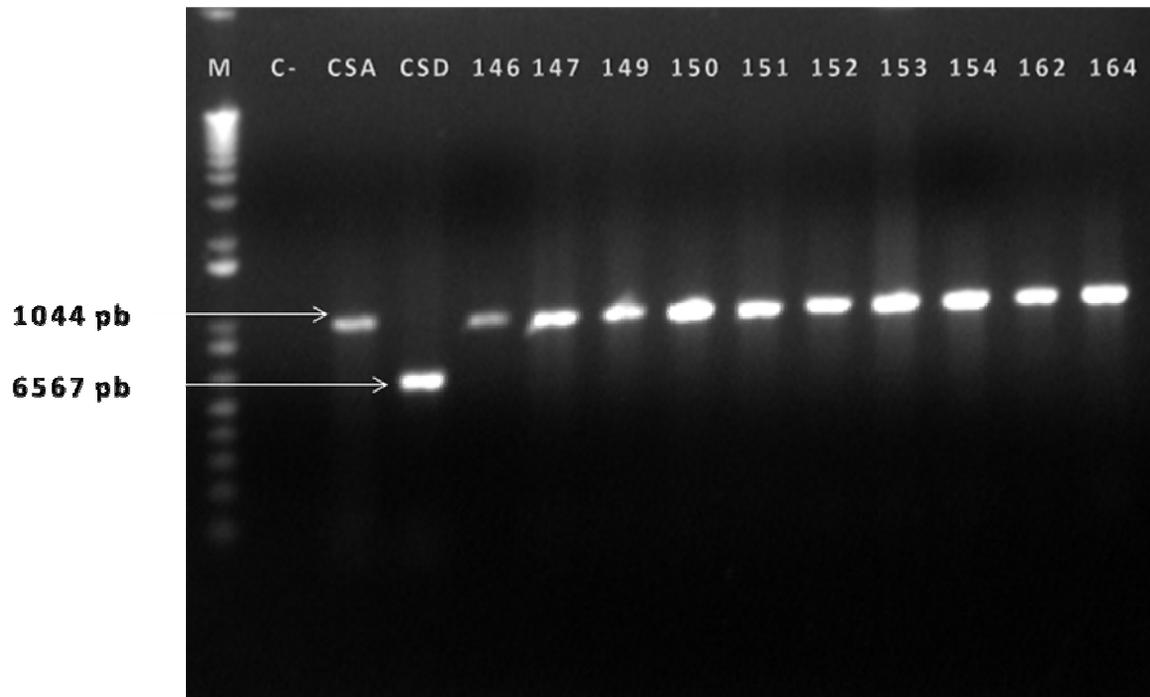


Figura 4. Producto de amplificación de PCR múltiple de las cepas de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador, C- control negativo, CSA control del serogrupo capsular A, CSD control del serogrupo capsular D, los números corresponden a las cepas estudiadas.

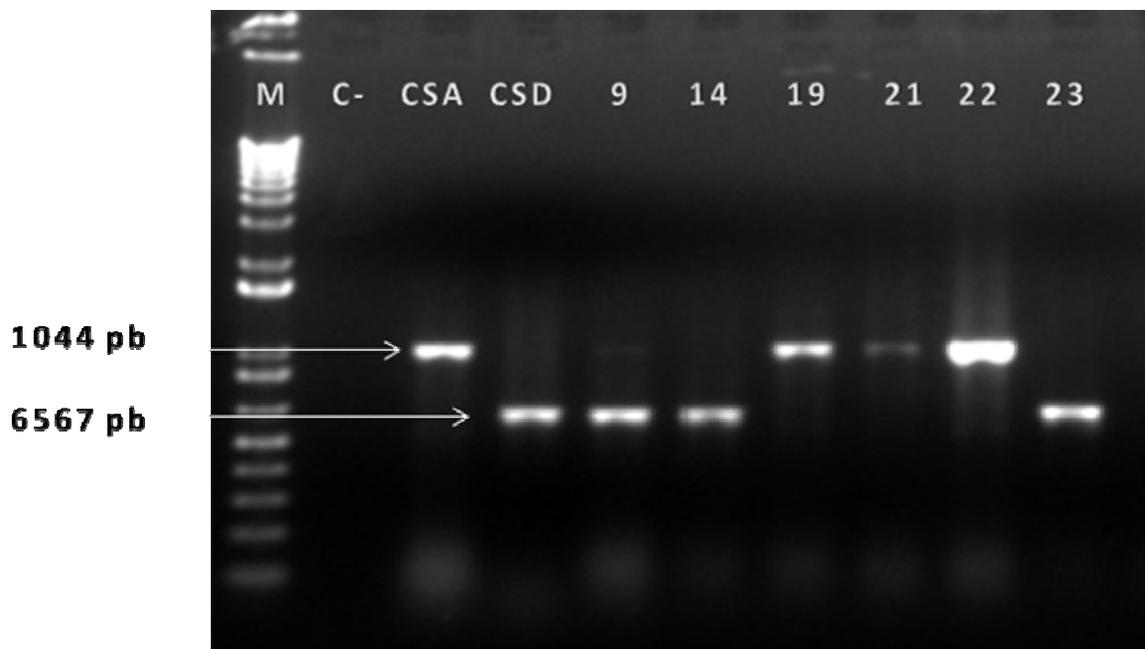


Figura 5. Producto de amplificación de PCR múltiple de las cepas de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador, C- control negativo, CSA control del serogrupo capsular A, CSD control del serogrupo capsular D, los números corresponden a las cepas estudiadas.

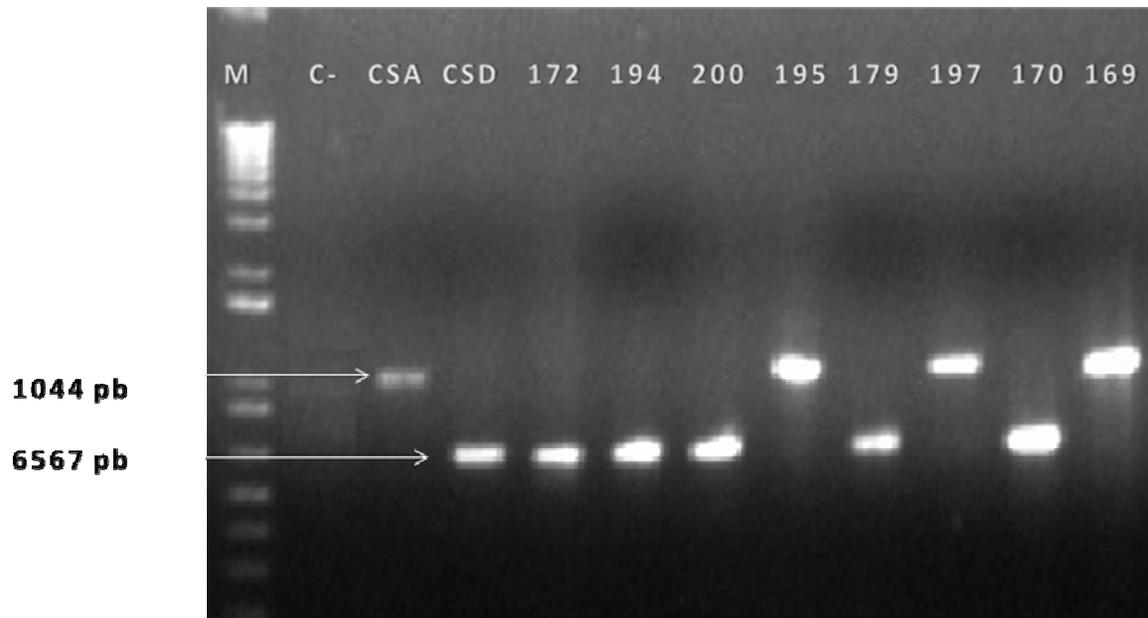


Figura 6. Producto de amplificación de PCR múltiple de las cepas de exudado nasal de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador, C- control negativo, CSA control del serogrupo capsular A, CSD control del serogrupo capsular D, los números corresponden a las cepas estudiadas.

De las cepas identificadas como SA (149) por PCR múltiple el 78% (116/149) provenían de bovinos clínicamente sanos y el 22% (33/149) de bovinos enfermos y de las cepas identificadas como SD (20), el 80% (16/20) provenían de bovinos clínicamente sanos y el 20% (4/20) de bovinos enfermos.

Se evaluó la concordancia entre las pruebas de hialuronidasa y acriflavina con la de PCR múltiple. La concordancia específica entre la prueba de hialuronidasa y la prueba de la PCR fue 88% y la concordancia absoluta de 92.8%; la concordancia específica entre la prueba de acriflavina y la prueba de la PCR fue de 4.7% y la concordancia absoluta de 92.8%. Con la prueba de Kappa se estableció una concordancia moderada, igual a 0.54 y un valor de P de 0.0001, con un intervalo de confianza de 95%.

DISCUSIÓN

Se ha reportado que *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* y *Pasteurella multocida* son los principales agentes bacterianos involucrados en procesos respiratorios en el ganado bovino.² Debido a las elevadas pérdidas económicas a causa de las neumonías, se han realizado diversos estudios alrededor del mundo para conocer más sobre los factores de virulencia, huéspedes y los agentes involucrados. En México se han identificado a los serogrupos A y D de *Pasteurella multocida* como los responsables de ocasionar pasteurelisis neumónica bovina.^{5,}

32, 59, 60, 63

Para la identificación bioquímica de *P. multocida* se dispone de métodos alternativos a los convencionales, los cuales se basan en sistemas comerciales miniaturizados que facilitan y agilizan la identificación, entre los cuales se encuentran los sistemas API20E y API20NE, los cuales se han empleado ampliamente como herramienta en la identificación de enterobacterias y no enterobacterias en medicina veterinaria, con resultados muy satisfactorios en cepas de *P. multocida* y *M. haemolytica*.^{59, 61}

Los resultados obtenidos del perfil bioquímico de las cepas estudiadas en este trabajo, en cuanto al porcentaje de identificación y tipicidad con respecto a *P. multocida*, concuerdan con los resultados obtenidos por Campuzano *et al*,⁵⁹ quien en el 97.5% de las cepas analizadas encontró un porcentaje de identificación del 96% y tipicidad de 1 a *P. multocida*, por lo cual se considera al sistema de

identificación API 20 NE como un método fácil de aplicar y de alta confiabilidad para la identificación de este microorganismo.

Diversos autores reportan que el uso de las técnicas de hialuronidasa y acriflavina son una herramienta útil y de fácil realización para caracterizar fenotípicamente las cepas de *P. multocida*, que disminuye muchos problemas presentes en la identificación mediante la prueba de hemoaglutinación indirecta, sin embargo existen inconvenientes como su limitada certeza y las condiciones de cultivo, ya que pueden estar influenciadas por la expresión de ciertas características fenotípicas de las cepas, e incluso en algunas ocasiones se pueden presentar falsos positivos o falsos negativos, además de requerir una amplia experiencia en la realización e implementación de estas técnicas.⁵⁹

La identificación del SA mediante la técnica de hialuronidasa en el 95.26% (161/169) de las cepas y del SD con la técnica de acriflavina, en el 4.74% (8/169), muestra un predominio de SA, lo cual coincide con diversos estudios realizados en México y otros países.

En Estados Unidos, Dabo *et al.*,⁶² reportó que el 100% de cepas de pulmones neumónicos de origen bovino fueron identificadas como SA, mediante técnicas serológicas.

En el caso particular de México, en todos los estudios realizados sobre caracterización fenotípica de las cepas de *P. multocida* de origen bovino y otros rumiantes, mediante las técnicas de hialuronidasa y acriflavina, el serogrupo predominante es el A. Investigaciones realizadas en bovinos con muestras de exudado nasal y pulmones neumónicos en el Estado de Hidalgo⁵ y con pulmones

neumónicos en el Estado de México,^{32, 62} reportaron la presencia del SA en el 100% de las muestras estudiadas. Blanco *et al.*,⁶³ reportan 61% para el SA, 25% al SD y 14% de las cepas no tipificables en pulmones neumónicos de bovinos.

El desarrollo de técnicas moleculares como la ribotipificación y la reacción en cadena de la polimerasa han sido utilizadas por diversos autores alrededor del mundo, ya que permiten detectar con claridad las variaciones genéticas entre las cepas y de esta forma facilitan su identificación.^{54, 55, 56} A nivel mundial, las frecuencias en la identificación capsular a través de estas técnicas son muy variadas. Principalmente se reporta al SA como el involucrado en problemas neumónicos, con porcentajes del 80 al 100%.^{59, 64, 65}

Las frecuencias encontradas en este trabajo, mediante la técnica del PCR múltiple, con predominio del SA (80.79%) sobre el SD (11.84%), es similar a lo reportado por diversos autores en México y otros países de América, Europa y Asia.

En el Reino Unido con cepas de origen bovino aisladas de tejido neumónico, provenientes de distintas regiones de Europa y Asia se reportó el 80.79% del SA, 11.53% del SB, 3.84% del SE y 3.84% del SF;⁶⁴ en otro trabajo realizado con cepas de origen bovino, colectadas por doce años en distintas regiones de Alemania, se reportó que el SA fue el predominante con el 92.3%, seguido por el SD con 3.3%, 2.2% del SF y 2.2% no tipificables.³⁹

En Dinamarca, con cepas de pulmones de bovinos provenientes de cinco países de Europa, mediante la técnica de ribotipificación se reportó el 98.11% del SA y 1.89% del SF.⁶⁵

En esta investigación la tipificación con la técnica convencional de acriflavina y la técnica molecular de PCR múltiple, detectó al gen *dcbF* perteneciente al SD en el 100% (8/8) de las cepas identificadas como dicho serogrupo (D), mediante la técnica de hialuronidasa y el gen *hyaD-hyaC* del SA, en el 92.5% (149/161) de las cepas fueron identificadas como serogrupo (A), en el 7.5% restante (12/161), se detectó el gen *dcbF* del SD con la técnica de PCR múltiple.

En consecuencia, los resultados entre las técnicas bioquímicas (hialuronidasa y acriflavina) y la PCR múltiple, concuerdan plenamente en la identificación del SD pero no con los del SA, ya que el 7.5% de las cepas identificadas como SA por hialuronidasa (falsas positivas) fueron SD por PCR.

Estos resultados coinciden en parte con los reportados por Campuzano *et al*,⁵⁹ quien en cepas de *P. multocida* de exudado bovino, en el Estado de Hidalgo, reportó que la PCR múltiple concordó con la prueba de hialuronidasa en la identificación del SA, pero no con la prueba de acriflavina, ya que el 20% de cepas identificadas como SD mediante dicha técnica fueron identificadas como SA por la PCR múltiple.

Estas discrepancias entre los resultados de las pruebas bioquímicas (hialuronidasa y acriflavina) con la técnica de PCR múltiple, pueden deberse a la dificultad de las pruebas fenotípicas, ya que las condiciones de cultivo pueden

influir en la expresión de las propiedades fenotípicas de las cepas, tales como la morfología, capacidad de fermentar carbohidratos, propiedades serológicas, además de la experiencia en la ejecución e interpretación de las técnicas. Adicionalmente hay que considerar que las cepas de *P. multocida* presentan las variantes mucosas, lisas iridiscentes y lisas no iridiscentes, todo lo cual puede confundir al momento de la identificación.⁵⁹

En otras especies animales, se ha reportado al SA como predominante. En pequeños rumiantes con frecuencias del 33 al 69.2% para el SA, 22 al 30.8% para el SD y hasta 44.44% para el SF; en cerdos del 35 al 69% del SA y del 29.16 al 62.8% para el SD;^{39, 63, 64} en perros y conejos exclusivamente el SA y en aves el 70 al 85.7% de SA y 14.3 al 30% de SF.^{35, 39}

Como se puede observar, en la mayoría de los estudios el SA se presenta en mayor frecuencia. Algunos factores, tales como: la variación de la zona geográfica de la cual fueron obtenidas las muestras, el manejo de los animales, las condiciones climáticas, las medidas de bioseguridad, la obtención del pie de cría del ganado que varía de una región a otra y la especie de origen, podrían también estar involucrados en las frecuencias de los serogrupos.

Año con año existe variación sobre el aislamiento de los agentes bacterianos mencionados previamente, involucrados en los procesos respiratorios. En años recientes se ha reportado un incremento en el aislamiento de cepas de *P. multocida* en las enfermedades respiratorias bovinas.² La identificación de los serogrupos capsulares de *P. multocida* prevalentes en un determinado

ecosistema, constituye una condición indispensable para el conocimiento cabal de la epidemiología de la pasteurelisis neumónica bovina, como una etapa indispensable para el diseño e implementación de programas de prevención y control eficaces y eficientes.

CONCLUSIONES

Las técnicas convencionales (hialuronidasa y acriflavina) mostraron diferencias respecto a la técnica de PCR múltiple para la identificación de los serogrupos capsulares de *P. multocida*.

La PCR múltiple logró identificar 7.5% cepas como falsos positivos del serogrupo A, las cuales pertenecen al serogrupo D.

La técnica de PCR múltiple es una herramienta muy útil para la identificación de *P. multocida* en un diagnóstico rutinario, o bien para posteriores investigaciones en el área de epidemiología.

Se corrobora que, de manera similar a otros países de Europa y América, en México el serogrupo predominante de *P. multocida* en bovinos es el serogrupo A.

REFERENCIAS

1. Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia*. *Frontiers in Biosciences* 2001; 1, 6: 1128-1150.
2. Welsh RD, Dye LB, Payton ME, Confer AW. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994-2002. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 426-431.
3. Pijoan AP, Chávez DJA. Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajos dos sistemas de alojamiento. *Vet Mex* 2003; 34: 333-342.
4. Pijoan AP. Factores de manejo asociados con la mortalidad de becerras en establos de Tijuana, Baja California, México. *Vet Mex* 1997; 28: 269-275.
5. Trigo TFJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cien Vet* 1987; 4:1-37.
6. Andrews AH, Blowey RW, Boy H, Eddy GR. Husbandry of cattle. 2ª Ed. Blackwell Publishing. Iowa U. S. A. 2004, 239-248, 286-289.
7. Hagan y Bruner: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4ª Ed. La Prensa Medica Mexicana S. A. México, D. F. 1983.
8. Pijoan C. Neumonía enzótica; Ciencia veterinaria. Editado por Moreno Ch R. 1:56-73. Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 1987.
9. Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M. Medicina interna y cirugía del bovino. Vol. 1. Interamericana. Buenos Aires, Argentina. 2005, 275-298.
10. Trigo TFJ. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Vet Mex* 1991; XXII 2:131-134.
11. Buchanan RE, Holt JG, Lessel EF. Index Bergeyana. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. 1966, 789.
12. Holt JG, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 1994. 196, 280-285.
13. Taxonomy browse. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=745> Citado noviembre 2007.
14. Carter GR, Studies on *Pasteurella multocida* I. A haemoagglutination test for the identification of serological types. *Am J Vet Res* 1955; 16: 481-484.
15. Rimler RB, Rhoades KR. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 615-618.

16. Heddleston KL, Gallaguer JE, Roberts PA. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis* 1972; 16: 925-936.
17. Boyce JD, Chung JY, Adler B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J Biotechnology* 2000; 83: 153-160.
18. Roberts IS. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 285-315.
19. Pandit KK, Smith JE. Capsular hyaluronic acid in *Pasteurella multocida* type A and its counterpart in type D. *Res Vet Sci* 1993; 54: 20-24.
20. Rimler RB. Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerization with mucopolisaccharidases. *Vet Rec* 1994; 134: 191-192.
21. De Angelis PL. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthetase. *Biochemistry* 1996; 35: 9768-9771.
22. De Angelis PL, Padgett MAJ. Identification and molecular cloning of chondroitin synthetase from *Pasteurella multocida* type F. *J Bacteriol* 2000; 275: 24124-24129.
23. Carter GR, Annau E. Isolation of capsular polysaccharides for colonial variants of *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res* 1953; 14: 475-478.
24. Rosner H, Grimmecke HD, Knirel YA, Shashkov AS. Hyaluronic acid and a (1-4)- β -D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. *Carbohydr Res* 1992; 223: 329-333.
25. Muniady N, Edgar J, Woolcock, Mukkur TKS. Virulence, purification, structure and protective potential of the putative capsular polysaccharide of *Pasteurella multocida* type 6:B. *Pasteurellosis in Production Animals* 1992; 43:47-54.
26. Heddleston KL, Walko LP, Roberts PA. Dissociation of a fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 1964; 8:649-657.
27. Snipes KP, Ghazikhanian GY, Hirst DC. Fate of *Pasteurella multocida* in the blood capsular system of turkeys following intravenous inoculation: comparison of an encapsulated, virulent strain with its avirulent, acapsular variant. *Avian Dis* 1987; 631: 254-259.
28. Tsuji M, Matsumoto M. Pathogenesis of fowl cholera: influence of encapsulation on the fate of *Pasteurella multocida* after intravenous inoculation in turkeys. *Avian Dis* 1989; 33: 238-247.

29. Frank GH. Pasteurellosis of cattle. In: Adlam C, Rutter JM (eds) *Pasteurella* and pasteurellosis. London, Academic Press. 1989; Dungworth DC. The respiratory system).
30. Boyce JD, Chung JY, Adler B. Genetic organization of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Vet Microbiol* 2000; 72: 121-134.
31. Chengappa MM, Myers RC, Carter GR. Capsular and somatic types of *Pasteurella multocida* from rabbits. *Can J Comp Med* 1982; 46:437-439.
32. Jaramillo ML, Aguilar RF, Trigo TJF. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros de México. *Vet Mex* 1987; 18:185-187.
33. Gutierrez PJA, Smith JE. Determinación de la presencia de ácido hialurónico en el material capsular de las cepas de *Pasteurella multocida* tipos A y D aisladas de pulmones de cerdo. *Vet Mex* 1993; XXIV 2: 113-116.
34. Moorkamp L, Nathues H, Spargser J, Tegel R, Beilage. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Vet J* 2007.
35. Shivachandra SB, Kumar AA, Gautam R, Vijendra PS, Saxena MK, Crivastava SK. Identification of avian strains of *Pasteurella multocida* in India by conventional and PCR assays. *Vet J* 2006; 172: 561-564.
36. May BJ, Zhang Q, Li LL, Paustian ML, Whittam TS, Kapur V. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98, 6; 3460-3465.
37. Wassenaar TM, Gastra W. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* 2001; 201: 1-7.
38. Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 265: 1-10.
39. Ewers C, Lübke-Becker A, Bethe A, Kießling S, Filter M, Wieler LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different host with various disease status. *Vet Microbiol* 2006; 114:304-317.
40. Ophir T, Gitnick DL. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environment Microbiol* 1994; 60:740-745.
41. Boyce JD, Adler B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B2). *Infect Immun* 2000; 68,6: 3463-3468.

42. Yeng CJ, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghodduzi M, Adler B. Role of capsule in the pathogenesis of cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun* 2001; 69, 4: 2487-2492.
43. Townsend KM, Boyce JD, Yeng CJ, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR Typing System. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 924-929.
44. Hunt ML, Adler B, Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 2000; 72: 3-25.
45. Chung JY, Zhang YM, Adler B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 166: 289-296.
46. Michael FS, Vinogradov E, Li J, Cox AD. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* genome strain Pm70 and identification of the putative lipopolysaccharide glycosyltransferases. *Glycobiology* 2005; 15, 4: 323-333.
47. Rietschel ET, Brade H. Endotoxinas bacterianas. *Investigación y ciencia.* 1992; 16-24.
48. Boyce JD, Lo RYC, Wilkie L, Adler B. *Pasteurella* and *Mannheimia* In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, editors. *Thoen Pathogenesis of bacterial infections in animal.* CO, Carlton Australia: Blackwell publishing 2004: 273-294.
49. Pradel E, Guiso N, Mendozzi FD, Loch C. Bordetella pertussis Ton B, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun* 2000, 68: 1919-1927.
50. Retledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2000, 54: 881-942.
51. Chengappa MM, Carter GR, Baile EW. Identification of type D *Pasteurella multocida* by counterimmunoelectrophoresis. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 721-723.
52. Carter GR, Subronto P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *Am J Vet Res* 1973; 29-30.
53. Carter GR, Rundell SW. Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Veterinary Record* 1975; 12: 345.
54. Leotta GA, Chinen I, Vigo GB, Gugliada J, Rivas M. Evaluación de dos técnicas de subtipificación molecular para el estudio de *Pasteurella multocida*. *Rev Argen Microbiol* 2006; 38: 190-196.
55. Blackall PJ, Mifflin JK. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. *Avian Pathol* 2000; 29: 271-287.

56. Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitrou JM, Dawkins HLS. Development of PCR Assays for species and type specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1096-1100.
57. Madigan MT, Martinks JM, Broock JP. *Biología de los microorganismos*. 10ª Edición. Pearson Prentice Hall. España. 2003, 312-314.
58. Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. 5ª Edición. ELSEVIER. España. 2004, 530-531.
59. Campuzano OVM, Jaramillo ACJ, Castro HR. Identificación molecular de los serogrupos capsulares A y D de *Pasteurella multocida* en bovinos de la cuenca lechera de Tizayuca México, mediante la prueba de PCR múltiple. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2007.
60. Jaramillo ACJ, Hernández CR, Campuzano OV, Suárez GF, Delgado GR, Trigo TF. Characterization of *Mannheimia* Sp. and *P. multocida* strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico. *J. Aminm Vet Ad* 2007; 6 (12): 404-409.
61. Dabo SM, Debey BM, Montelongo M, Confer W. Genomic DNA restriction site heterogeneity in bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates detected with rRNA probe. *J. Med Microbiol* 1999; 48: 279-286.
62. García HE, Trigo TFJ, Sánchez –Mejorada PH, Aguilar RF. Serotipos de *Pasteurella multocida* en bovinos productores de carne en México. *Vet Mex* 1988; 19: 199-201.
63. Blanco VFJ, Trigo TFJ, Jaramillo ML, Aguilar RF. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from México. *Lat – Amer. Microbiol.* 1995; 37: 121-126.
64. Davies RL. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by Comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology* 2004; 150: 4199-4210.
65. Christensen H. Ageren Ø, Elmerdahl O, Bisgaard M. Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiology* 2004; 150: 1757-1767.