



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACIÓN DE LOS TIPOS CAPSULARES DE *Pasteurella multocida* EN EXUDADO FARÍNGEO DE BOVINOS PRODUCTORES DE CARNE CLÍNICAMENTE SANOS EN EL ESTADO DE QUERÉTARO.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA
ANA LILIA VILLEGAS VÁZQUEZ

Asesores:
Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango
M en C. Víctor Manuel Campuzano Ocampo



México, D. F.

2013

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, como muestra de que el esfuerzo rinde sus frutos, tal y como lo hemos aprendido a lo largo de toda la vida.

A los estudiantes de Medicina Veterinaria y Zootecnia, como testimonio de que toda meta se puede alcanzar. Que basta una idea inquietante para montar un proyecto y emprender la travesía del viaje más maravilloso de todos: el descubrimiento.

Para todo aquél que busca la respuesta a una duda que todavía no surge, para todos aquellos que forman parte del proceso de investigación, fieles testigos de la evolución del pensamiento humano que comienza con un poco de imaginación y entusiasmo.

Para todos los que estuvieron, los que están y los que vendrán.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, esa fuerza creadora que da vida y continúa en un ciclo interminable “en complicidad con la naturaleza y hermandad con los animales”.

A mis padres, por ser motivo de mi mayor esfuerzo y mis más grandes logros, por impulsarme y llegar conmigo a la meta. Por todo su amor y sus regaños.

A mis hermanos, por caminar a mi lado, nunca dejarme sola, por iluminarme con su sabiduría y alegrarme la vida.

A mis sobrinos, por ser alegría y travesuras interminables, por recordarme la importancia de la inocencia y que un “abrazo de koala” lo cura todo.

A mis abuelitos, por ser los primeros que me dieron la oportunidad de convivir con animales, que me enseñaron a amarlos, cuidarlos y dejarlos ir.

A mis tíos y primos, por su cariño y consejos. A esas hermosas personas que comenzaron este viaje conmigo y ya no están.

A mis amigos: los de ayer, los de hoy y los de toda la vida. A Nallely Limeta por tu compañía, tú vitalidad y entusiasmo. A Salvador Pérez por estar en los momentos difíciles.

A mis hermanos de hato: Alejandra García (por todo, por luchar y ganar, por nunca dejar que me rindiera, por tus locuras, por ser única), Adriana Almarás (por tu ímpetu, tu fortaleza, tus consejos y apapachos), Angélica Martínez (por las risas, tu “p. de viejitos”, por ser una mujer fuerte en la tempestad), Elena Balladares (por tu paciente amistad, tu sinceridad, por ser la más sensata de mis hermanas, por tus horas dedicadas a escucharme y por impulsarme, por siempre estar al pie del cañón), Samantha Llanos (por toda tu ayuda durante la realización de esta tesis, por las experiencias vividas en Tequisquiapan, por tus abrazos, tu cariño y tu amistad incondicional, por esos dos años en el infierno) Erick Gómez (por ser el más leal, más fuerte y protector, por demostrar que no importa quien esté en tu contra, siempre se puede salir adelante y ser el número 1).

A todas las personas maravillosas que conocí y con quienes viví en Querétaro.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por forjarme como una profesional en el área, por hacerme una mujer consciente de la realidad social en la que vive y por expandir mi mente más allá de los límites de la ignorancia. Por sembrar en mi la semilla de la investigación y por llenarme de pasión por el conocimiento.

Al proyecto CONACyT CB104031 por la beca y las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

A mis asesores: Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango y M en C. Víctor Manuel Campuzano Ocampo, por su paciente apoyo y por los conocimientos aportados en el desarrollo de esta tesis.

A las personas que laboran en la USEDICO: Dra. Myrna Vicencio, Dra. Irma Eugenia Candanosa, Dr. Alejandro De la Peña, Eloy, por sus enseñanzas y cariño.

A mis compañeros de laboratorio: Mario Hidalgo (te quiero "P"), Azaf Moreno Torres y al GRILLEP.

A mis compañeros tesistas y al personal del Departamento de medicina preventiva y salud Pública FMVZ-UNAM.

A los animales, por quienes estoy en este camino mejorando día con día. A Eriol y Travis, por llenar mi corazón de amor y mi vida de ronroneos.

Yo no sé mañana...

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
• Pasteurellosis bovina.....	3
• <i>P. multocida</i>	4
• Características morfológicas y bioquímicas de <i>P. multocida</i>	5
• Factores de virulencia	5
• Métodos de identificación para <i>P. multocida</i>	7
• PCR para la tipificación de grupos capsulares de <i>P. multocida</i>	7
• Importancia en la salud pública.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
• Objetivo general.....	11
• Objetivos particulares.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
• Diseño del muestreo.....	11
• Obtención y tipo de muestras.....	12
• Aislamiento e identificación de las cepas de <i>P. multocida</i>	12
• Identificación bioquímica de <i>P. multocida</i>	13
• Caracterización de los grupos capsulares de <i>P. multocida</i>	14
• Extracción de ADN.....	14
• PCR.....	15
RESULTADOS.....	15
• Identificación morfológica de las cepas de <i>P. multocida</i>	15
• Identificación de las cepas de <i>P. multocida</i> mediante el sistema API 20NE...	16

- Tipificación molecular.....18
- Frecuencia de *P. multocida* en bovinos destinados a la producción de carne clínicamente sanos.....19

DISCUSIÓN.....20

CONCLUSIONES.....23

REFERENCIAS.....24

RESUMEN

VILLEGAS VÁZQUEZ ANA LILIA. Caracterización de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos productores de carne clínicamente sanos en el estado de Querétaro. (Bajo la dirección del Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango y M en C. Víctor Manuel Campuzano Ocampo).

El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar los tipos capsulares de *P. multocida* en exudado faríngeo en bovinos destinados a la producción de carne en el estado de Querétaro. Se obtuvieron 227 muestras, mediante hisopo, de exudado faríngeo de animales clínicamente sanos en una planta de sacrificio ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro. Las muestras fueron sembradas en agar sangre a partir del hisopo e incubadas a 37°C por 24 h en aerobiosis. Las cepas fueron identificadas a través de características morfológicas, pruebas bioquímicas convencionales y el microsistema comercial API 20NE. La tipificación de los grupos capsulares A y D se realizó por medio de una PCR múltiple para la amplificación de los genes *hyaD-hyaC* y *dcbF* respectivamente. De acuerdo con los valores establecidos por el software API WEB, se logró la identificación de un 14.09% (32/227) cepas de *P. multocida*, que mostraron un porcentaje de identificación de 96%, y una tipicidad de 1 a *P. multocida*. Por medio de la PCR múltiple se logró la amplificación de los genes *hyaD-hyaC* correspondientes al grupo capsular A en el 100% (32/32) de las cepas identificadas previamente como *P. multocida*. No existen datos similares en México sobre la identificación y caracterización de *P. multocida* en bovinos especializados en la producción de carne. Con los resultados obtenidos se corrobora que, de manera similar con otros países de Europa y América, en México el grupo capsular predominante de *P. multocida* es el A.

Palabras clave: *Pasteurella multocida* TIPOS CAPSULARES, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, EXUDADO FARÍNCEO, BOVINOS, PCR.

INTRODUCCIÓN.

El Complejo Respiratorio Bovino (CRB) es un problema de salud animal con gran impacto en la industria de la producción de carne. Es la principal causa de morbilidad (70%-80%) y de mortalidad (40%-50%) en los corrales de engorda en los Estados Unidos, contribuye a pérdidas económicas y afecta el desempeño de la producción, la salud animal y la calidad de la canal. El CRB se conforma por tres entidades clínicas: neumonía enzoótica de los terneros, neumonía intersticial y la pasteurelisis neumónica; esta última se describe como una enfermedad de curso agudo que afecta a los bovinos jóvenes y adultos, en la cual se involucran microorganismos de la familia *Pasteurellaceae* como son: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni* otros agentes como el virus de la rinitis infecciosa bovina (IBR).^{1,2}

Los factores predisponentes para la presentación del CRB en el ganado son: la tensión producida por el traslado de los animales, el hacinamiento, la mezcla de animales de diferentes edades y región geográfica, cambios en la alimentación, la privación de agua y alimento, los cambios oxidativos por estrés y el cambio drástico de la temperatura.^{3,4}

Los principales patógenos presentes en el CRB son parte de la microbiota normal de las vías respiratorias de los bovinos. *Pasteurella multocida* es uno de los principales microorganismos aislados dentro del complejo respiratorio bovino al igual que *Mannheimia haemolytica*, estos microorganismos colonizan normalmente la nasofaringe de diversos animales domésticos y silvestres, cuando existen condiciones de tensión (estrés) o bien infecciones virales, pueden producir una neumonía fibrinosa de curso agudo. *P. multocida* participa como agente oportunista y, en algunas ocasiones, como patógeno primario; puede sobrevivir por largos periodos en materia orgánica y hasta un año en el agua.^{5,6}

PASTEURELOSIS PULMONAR BOVINA.

La pasteurelosis pulmonar es desencadenada por factores estresantes, los cuales al presentarse durante un tiempo prolongado conducen a la hipersecreción de corticosteroides, lo que provoca decremento en la función leucocitaria, comprometiendo así la respuesta inmune del hospedador a los agentes infecciosos.^{6,7} Los agentes virales involucrados: herpesvirus bovino tipo 1, virus sincitial respiratorio bovino, diarrea viral bovina y parainfluenza 3, que causan un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar, y el daño al tejido favorece la colonización del pulmón por la microbiota del hospedero. Una vez que las bacterias se establecen en los pulmones, el daño al tejido está mediado por diversos mecanismos. Las toxinas juegan un papel importante en la patogénesis de la neumonía bacteriana, la endotoxina tiene una serie de efectos tóxicos que incluyen la iniciación de las cascadas del complemento y la coagulación, la activación de los granulocitos y macrófagos, aumentando el daño en los tejidos. La fracción C de la cápsula de *P. multocida* inhibe la función de los neutrófilos e inhibe la fagocitosis destruyendo a los macrófagos. De esta manera, gran parte del daño pulmonar en la neumonía provocada por *P. multocida* se debe a inflamación pulmonar. El lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared de las bacterias Gram negativas está implicado en el daño pulmonar debido a que activa la cascada del complemento. Esto resulta en un aumento de la permeabilidad vascular, que conduce a la acumulación de células inflamatorias, edema y la deposición de fibrina intravascular y extravascular.⁸⁻¹⁰

Los signos clínicos se observan en los animales de 7 a 10 días después de un evento estresante (movilización y traslado), o aproximadamente 27 días después de su llegada al corral de engorda. Los microorganismos presentes en la cavidad nasal son una fuente de infección que puede transmitirse a través de la inhalación de aerosoles que contienen a las bacterias, por contacto directo, o por la ingestión de alimentos o agua contaminados con las secreciones nasales de los animales infectados.⁶ La identificación de los animales afectados es importante debido a

que el comportamiento exhibido por los animales enmascara los signos tempranos retrasando la detección y el tratamiento.⁷ Las manifestaciones pueden ir de lo inaparente hasta la muerte, los signos clínicos incluyen fiebres de hasta 42°C, anorexia, hipersecreción conjuntival, rinitis mucopurulenta, tos, incremento en la frecuencia respiratoria aunque después se presenta disnea severa que puede conducir a una respiración oral; la auscultación revela fricción pleural y pulmonar debido a la consolidación.⁸ Los animales afectados extienden el cuello, abducen los miembros anteriores para expandir el volumen de la cavidad torácica. 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 pasteurelosis se presenta con mayor frecuencia en otoño e invierno.^{9,11}

Pasteurella multocida.

En 1880, Louis Pasteur aisló por primera vez *P. multocida* y determinó que la bacteria era el agente causante del cólera aviar, también demostró que al hacer pases repetidos de la bacteria se produce una cepa atenuada incapaz de causar enfermedad, la inoculación de aves con esta cepa podía provocar una respuesta inmune protectora. 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 provocada por esta bacteria. Trabajos sucesivos reconocieron propiedades bioquímicas y morfológicas comunes entre las bacterias no hemolíticas que causaban septicemia hemorrágica en los animales y fueron clasificadas como *Pasteurella multocida* en 1939.^{10,12}

P. multocida se subdivide en cuatro subespecies, que incluye a *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*, *gallicida*, *septica* y *tigris*.¹² *P. multocida* puede clasificarse en cinco grupos capsulares: A, B, D, E y F, de acuerdo a los diferentes polisacáridos de la cápsula. La distribución geográfica de estos grupos

es variable, los grupos B y E producen la septicemia hemorrágica que afecta a los búfalos de agua y al ganado bovino en Asia, África y sur de Europa. Se ha demostrado que los grupos capsulares A y D afectan al ganado bovino en México. La determinación de la prevalencia contribuye en la elaboración de productos biológicos para la prevención y control de la pasteurelisis neumónica.^{13,14}

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE *P. multocida*.

P. multocida es un pequeño cocobacilo pleomórfico Gramnegativo. Presenta cápsula, es inmóvil y mide 0.3- 1.0 μm de largo, aerobio y anarero bio facultativo, catalasa y oxidasa positivos, sin presencia de hemólisis ni producción de gas.¹³ Crece después de incubarse por 18-24 horas en un rango de temperatura de 25 a 40 °C, siendo 37 °C la óptima para su desarrollo. Forma colonias que miden de 1 a 2 mm de diámetro, presentan tres variaciones: mucoides, lisas iridiscentes y lisas no iridiscentes. Con la tinción de Wright presentan una típica tinción bipolar. Crece bien en medios enriquecidos como agar sangre, agar chocolate y agar Mueller Hinton, pero no crece en agar MacConkey.^{15,16}

FACTORES DE VIRULENCIA.

Cápsula.

Es la base para la identificación de los 5 grupos capsulares conocidos A, B, D, E y F.^{17,18} Las cepas de *P. multocida* producen una cápsula de polisacáridos que difiere en su composición dependiendo del grupo capsular. El grupo capsular A posee una cápsula de ácido hialurónico, mientras que D y F tienen cápsulas con heparina y condroitin respectivamente; el grupo B presenta manosa, glucosa y glucosamina. La cápsula de las cepas puede contribuir significativamente a la virulencia, pues tiene propiedades antifagocíticas y pirógenas, claramente juega un papel importante en la protección de las bacterias contra los mecanismos inmunes del hospedero.^{15,17}

Lipopolisacárido (LPS).

El LPS es considerado un antígeno que posee las funciones de las endotoxinas de las bacterias Gram negativas: pirogénica, activación de macrófagos, inducción del factor de necrosis tumoral, activación de la cascada de la coagulación, agregación de plaquetas, estimulación de la inmunidad humoral. Dicho antígeno es uno de los principales factores de virulencia en las enfermedades ocasionadas por *P. multocida*.¹⁸

Proteínas captadoras de hierro

El hierro es un nutriente esencial para *P. multocida*, se ha observado que bajo condiciones carentes de este elemento, es capaz de secretar un factor de crecimiento que funciona como un sideróforo. El hierro soluble es generalmente escaso en los tejidos del hospedero; así *P. multocida* ha desarrollado un sistema de captación de hierro mediado por sideróforos, éstos tienen gran afinidad y lo captan de las moléculas libres de hierro en los tejidos.^{17,19}

Fimbria.

Se ha confirmado la participación de la fimbria en el proceso de adhesión a la superficie celular del hospedero. Las fimbrias son los principales mecanismos de adherencia al epitelio mucoso del hospedero y trabajan en conjunto con el material capsular, esta característica está relacionada directamente con la virulencia.²⁰

Toxinas.

Las cepas de *P. multocida* producen toxinas en particular las del grupo capsular D, que posee una dermonecrotina (DNT) la cual tiene acción citotóxica en células de pulmón de embriones de bovino, también es causante de la rinitis atrófica en el cerdo.²¹

Métodos de identificación para *P. multocida*

El diagnóstico de las enfermedades producidas por *P. multocida* se ha basado tradicionalmente en la identificación de signos clínicos y características fisicoquímicas del agente. Estas pruebas se realizan con base en cualidades fenotípicas; sin embargo, las condiciones del cultivo pueden influir en la expresión de algunas características, como la morfología, fermentación de carbohidratos y propiedades serológicas, y con ello disminuir la sensibilidad y especificidad de los métodos basados en estas características.²²

Carter (1967) propuso dos técnicas no serológicas para la tipificación capsular, la técnica de hialuronidasa para identificar el grupo capsular A, que se basa en la despolimerización de la cápsula del ácido hialurónico al estar en contacto con una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de hialuronidasa y la floculación por acriflavina para identificar el grupo capsular D, técnicas que tardan de 3 a 5 días, respectivamente, para una identificación completa.^{23,24}

En años recientes las técnicas de biología molecular 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 detección de organismos directamente de las muestras clínicas, así se mejora la sensibilidad, la especificidad y el tiempo requerido para la identificación del microorganismo disminuye. Particularmente la PCR, ha sido muy útil, pues con el uso de iniciadores específicos resulta fácil la identificación del género y los grupos capsulares.^{22,25}

PCR para la tipificación de los grupos capsulares de *P. multocida*

El desarrollo de la técnica de PCR ha demostrado ser un método rápido y sensible para el diagnóstico de enfermedades, siendo 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 amplificar el ADN y una pequeña cadena de nucleótidos que puede unirse a la molécula que se desea copiar o amplificar para que sirva como iniciador o “primer”.^{22, 26}

El genoma de *P. multocida* ha sido objeto de estudio con la finalidad de obtener información sobre su replicación, factores de virulencia y cómo evade al sistema inmune. 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, 6 operones ARNr y 57 ARNt. En dicho análisis se identificaron 104 genes asociados a la virulencia del microorganismo.^{27,28}

Los genes de virulencia codifican y regulan la actividad de los factores involucrados en la interacción de los patógenos con el hospedero, o bien se encuentran implícitos en los procesos metabólicos y originan el desarrollo de la patogénesis de la enfermedad.²⁹

La secuencia de nucleótidos de los genes que codifican para la síntesis de la cápsula de *P. multocida* A, fue publicada en 1998¹⁴ la cual fue descrita con 11 marcos abiertos de lectura, 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.^{25,26,30}

De acuerdo con lo descrito por Boyce (2000),¹⁴ el producto de los primeros cuatro genes (*hexABCD*) de la región 1 se encuentran involucrados en la exportación de los polisacáridos a la superficie, que a su vez forman 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*.^{26,31}

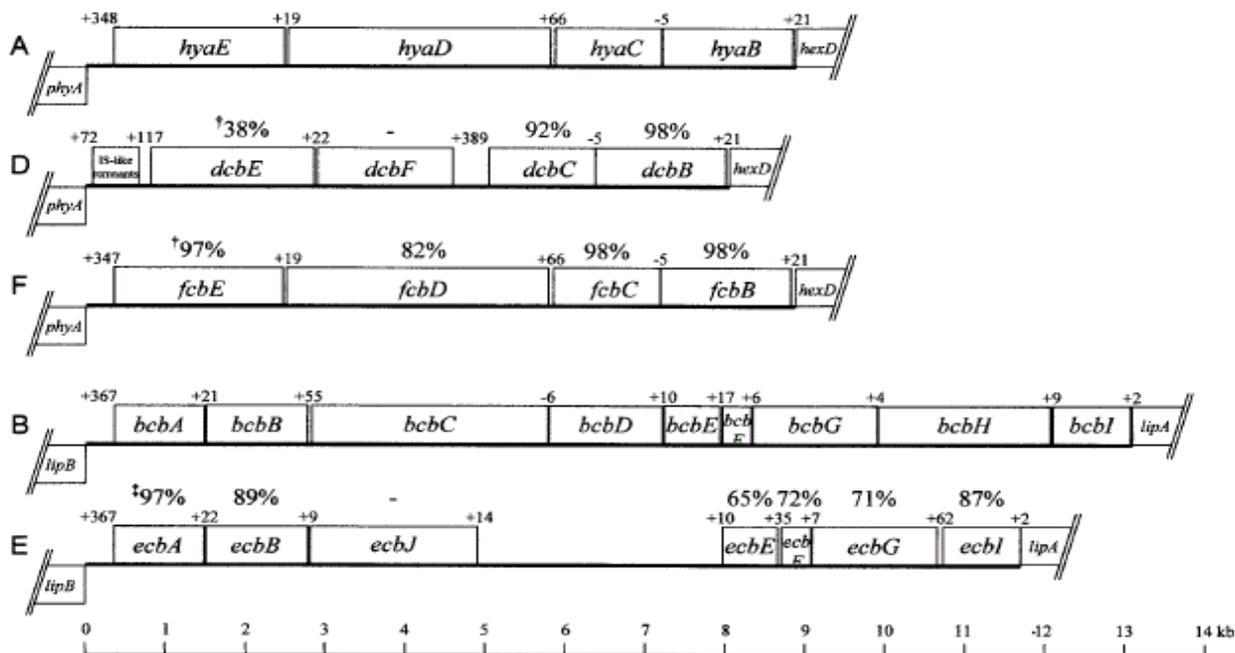


FIGURA 1. Organización genética de los diferentes grupos de *P. multocida*. Los números indican la distancia en pares de bases entre la última base del gen anterior y la primera base del siguiente gen.³⁰

Los productos de los cinco genes siguientes (*hyaABCDE*) de la región 2 (Figura 1) codifican para las proteínas involucradas en la formación de los monómeros de azúcar activados y el ensamble de los polisacáridos (ácido hialurónico) del grupo capsular 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 participa en agregar los monómeros

activados de azúcar para la formación de los polisacáridos. Las funciones de los genes *hyaB* y *hyaE* aún permanecen desconocidas.^{26,31}

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.^{26,31}

Importancia en la salud pública.

En estudios epidemiológicos se ha aislado *P. multocida* de la faringe y de las secreciones respiratorias en el 2 a 3% de las personas que tienen contacto con animales (perros y gatos). La colonización se presenta con mayor frecuencia en las personas que presentan enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y bronquiectasias, en ancianos y en pacientes con algún tipo de inmunodepresión. En estas circunstancias, *P. multocida* puede comportarse como patógeno oportunista y, a partir de la mucosa respiratoria colonizada, invadir los tejidos, causando cuadros de neumonía, bronquitis, empiema y abscesos pulmonares. Con menor frecuencia, se presentan infecciones de vías altas: sinusitis, epiglotitis y otitis.^{13,32}

Generalmente, el hombre adquiere la infección por inoculación directa, por arañazos o mordeduras de animales, especialmente de gatos y perros. *P. multocida* es la causa más frecuente de infección de heridas producidas por mordedura de gato. Con menor frecuencia, se producen infecciones de heridas abiertas, no causadas por mordedura.¹³

JUSTIFICACIÓN

En México se cuenta con estudios previos sobre la caracterización y prevalencia de los tipos capsulares de *P. multocida* en bovinos destinados a la producción de leche, aún no se han realizado estudios en bovinos destinados a la producción de carne.

HIPÓTESIS

Es posible el aislamiento de *Pasteurella multocida* en muestras provenientes de bovinos productores de carne clínicamente sanos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar las cepas de *Pasteurella multocida* presentes en exudado faríngeo proveniente de bovinos clínicamente sanos destinados a la producción de carne.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Realizar el aislamiento de *Pasteurella multocida* en vías respiratorias altas de bovinos clínicamente sanos.

- Identificar los diferentes tipos capsulares de *Pasteurella multocida* mediante PCR múltiple aislados durante el estudio.

- Estimar la frecuencia de *Pasteurella multocida* en bovinos clínicamente sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del muestreo

Se consideró una prevalencia del 18% con base en estudios previos¹⁷ se calculó el tamaño mínimo de muestra (TMM) con un 95% de confianza y un error estimado de 5%. Aplicando la siguiente ecuación:

$$n = z^2 \times p \times q / d^2$$

En la que:

z= nivel de confianza al 95%= 1,96

p= probabilidad de que ocurra el evento o prevalencia.

$q = 1 - p$, probabilidad de que no ocurra el evento

d = error estimado

Con base en dicha ecuación, el TMM fue de 227 bovinos para determinar la proporción de animales positivos a *P. multocida*.

Obtención y tipo de muestras de estudio.

La obtención de las muestras se llevó a cabo en la planta de sacrificio de la Distribuidora de Carne del Bajío (DICABSA) ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro, en bovinos provenientes del mismo municipio; dichos animales fueron muestreados después del sacrificio y previo al lavado de las cabezas.

Se colectaron muestras de exudado faríngeo mediante hisopos estériles que se colocaron en medio de transporte Stuart y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento, el cual fue llevado a cabo en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública Veterinaria y en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Aislamiento e identificación de *P. multocida*

El aislamiento e identificación de las colonias se realizó por siembra en cajas de agar sangre a partir del hisopo, se incubaron en aerobiosis durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se realizó la tinción de Gram. Se observaron las características morfológicas de las colonias y se seleccionaron aquellas que coincidieron con las de *P. multocida*: redondas, grises, mucoides y sin presencia de hemólisis. Se llevaron a cabo las pruebas de identificación de catalasa y oxidasa. Se realizó una nueva siembra con el fin de obtener cultivo puro de las cepas de *P. multocida*, y posteriormente se realizó la identificación bioquímica mediante un microsistema comercial de identificación.

Identificación bioquímica de *P. multocida*

Se realizó la identificación bioquímica de las cepas de *P. multocida* mediante el sistema API 20NE*. El cual posee una galería con 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación (Cuadro 1), conteniendo medios y/o sustratos en forma deshidratada. Se prepararon las cámaras de incubación repartiendo aproximadamente 5mL de agua destilada en los alveolos del fondo para crear una atmósfera húmeda. Las pruebas se realizaron a partir de colonias incubadas durante 18 a 24 horas en agar sangre al 5%. Los ensayos convencionales se inocularon con una suspensión bacteriana al 0.5 en la escala de McFarland de la cepa en solución salina, se rellenaron los tubos (y no las cúpulas) de los ensayos desde el NO₃ hasta al PNPG. Los ensayos de asimilación de carbohidratos se inocularon con un medio provisto por el fabricante (API AUX Medium), al que se transfirieron 200 µL de la suspensión precedente y se rellenaron los tubos y las cúpulas desde el GLU al PAC. Finalmente se cubrieron con aceite las cúpulas de los ensayos GLU, ADH y URE. Las reacciones se produjeron tras un periodo de incubación de 24 horas a 30°C y se tradujeron en cambios de color, por el uso del sustrato (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) o bien inducidos por la adición de reactivos (NO₃, TRP). Los ensayos se reincubaron 24 horas a 30°C para validar la identificación. La lectura de las reacciones se realizó utilizando la tabla de identificación provista por el fabricante, la identificación se realizó con un perfil numérico y el reconocimiento mediante el software de identificación en línea (APIWEB).

* bioMérieux sa F-69280 Marcy l'Etoile, France.

Cuadro 1: Identificación de los ensayos y sus componentes activos en el sistema API 20NE.

Ensayo	Componentes activos
NO ₃	Nitrato potásico (reducción de nitratos en nitritos)
TRP	L-triptofano
GLU	D-glucosa
ADH	L-arginina
URE	Urea
ESC	Esculina (citrato férrico)
GEL	Gelatina
PNPG	4-nitrofenil-βD-galactosidasa
GLU	D-glucosa
ARA	L-arabinosa
MNE	D-manosa
MAN	D-manitol
NAG	N-acetil-glucosamina
MAL	D-maltosa
GNT	Gluconato potásico
CAP	Ácido cáprico
ADI	Ácido adípico
MLT	Ácido málico
CIT	Citrato trisódico
PAC	Ácido fenilacético
OX	Oxidasa

Caracterización molecular de los grupos capsulares de *P. multocida*

Extracción de ADN.

Las cepas identificadas como *P. multocida* mediante el sistema API20NE fueron resembradas en agar sangre al 5% e incubadas a 37 °C durante 24 horas. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el método de choque térmico.³³ Se suspendió una asada de la muestra bacteriana en 200μL de agua destilada estéril la cual se sometió a una temperatura de 92°C (ebullición) durante 15 minutos. Se

centrifugó a 8000xg durante 15 minutos, y se tomaron 5 µL del sobrenadante (ADN) para agregarlos a la mezcla de la PCR.

PCR

Para la caracterización de los tipos capsulares los genes amplificados fueron: para el A, *hyaD-hyaC* que codifican para la síntesis de ácido hialurónico, por medio de los iniciadores 5'-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3' y 5'-TTGCCATCATTGTCAGTG-3' y para el grupo capsular D el gen amplificado fue *dcbF* que codifica para la síntesis de una glicosil transferasa del operón capsular, para lo cual se emplearon los iniciadores 5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' y 5'-CATCTACCCACTCAATATCAG-3' La caracterización molecular se realizó por medio de una PCR múltiple tomando como base el protocolo descrito por Campuzano *et al.* (2011). La amplificación se realizó en un termociclador* bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, elongación a 56.5°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos por 30 ciclos. La extensión final a 72°C por 5 minutos. Las reacciones se mantuvieron a 4°C hasta su visualización.

Se colocaron 32.5 µL de agua destilada estéril, 5µL de amortiguador 1x PCR, 3 µL MgCl₂, 2 µL de DNTP`S, 0.5 µL de cada uno de los iniciadores, 5 µL de ADN y 0.5 µL de Taq ADN Polimerasa.

La visualización de los productos amplificados se efectuó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio al 10% (10mg/mL).

RESULTADOS

Identificación morfológica de las cepas de *P. multocida*

* MAXYGENE 198 Cambridge Street, Wembley WA 6014, AUSTRALIA.

De un total de 227 muestras procesadas, se recuperaron 77 aislados (33.92%) que correspondieron a la morfología de *P. multocida* (redondas, grisáceas, mucoides y sin presencia de hemólisis). Posteriormente se realizó la tinción de Gram, en donde 54 colonias (23.78%) correspondieron a cocobacilos Gramnegativos.

Finalmente se utilizaron las pruebas de oxidasa y catalasa, resultando 50 aislamientos (22.02%) positivos (Figura 2).

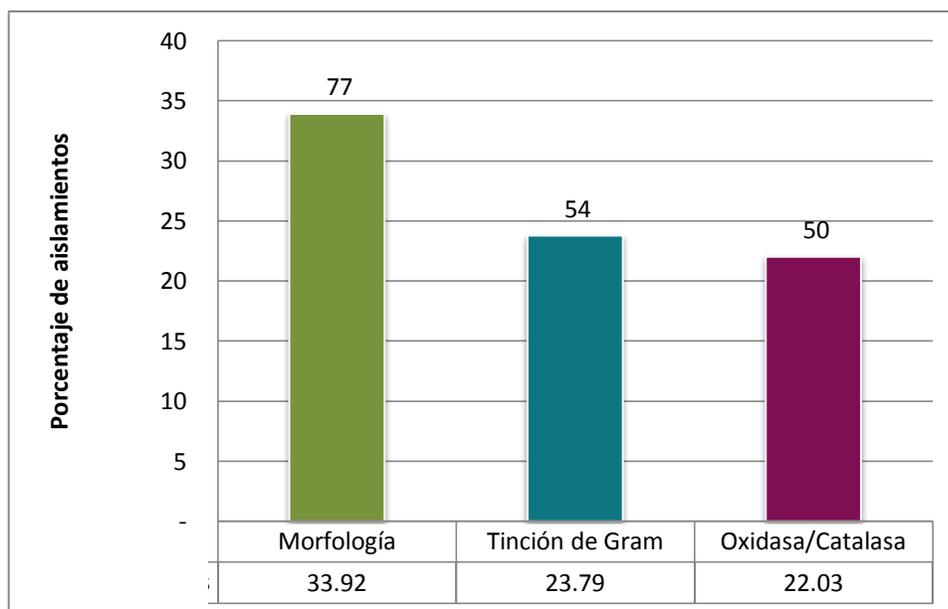


Figura 2. Aislamientos provenientes de exudado faríngeo de bovinos destinados a la producción de carne en el estado de Querétaro.

Identificación bioquímica de las cepas mediante API 20NE.

Los 50 aislados que resultaron positivos a los ensayos de catalasa y oxidasa, fueron sometidos al microsistema API 20NE para obtener la identificación bioquímica definitiva y se obtuvieron los siguientes resultados: el 64% (32/50) mostraron un porcentaje de identificación del 96% y tipicidad de 1 a *P. multocida*, y el 24% (12/50) correspondieron a *Pasteurella* spp con un porcentaje de identificación y tipicidad menores al 96% y 1, respectivamente.

En el siguiente cuadro se describen los resultados positivos a las pruebas bioquímicas contenidas en la galería API20NE de los aislamientos estudiados.

Cuadro 2. Perfiles bioquímicos de las cepas de *P. multocida* aisladas de exudado faríngeo de bovinos clínicamente sanos, en el estado de Querétaro.

Pruebas bioquímicas	% Positivos
Reducción de nitratos a nitritos	100
Triptófano	73
D-glucosa	100
L-arginina	100
Urea	100
Esculina	0
Gelatina	0
Galactosidasa	0
D-glucosa	0
L-arabinosa	0
D-manosa	0
D-manitol	0
N-acetil-glucosamina	0
D-maltosa	0
Gluconato potásico	0
Ácido cáprico	0
Ácido adípico	0
Ácido málico	0
Citrato trisódico	0
Ácido fenilacético	0
Hemólisis	0
Oxidasa	100

Tipificación molecular.

Mediante la prueba de PCR se amplificaron los genes *hyaD-hyaC* para el grupo capsular A y el gen *dcbF* para el grupo D cuyos productos de amplificación tuvieron un peso molecular esperado de 1044 pb para el grupo A y de 657pb para el grupo D (Figura 4), que concuerdan con lo publicado por Townsend *et al.* (2001).

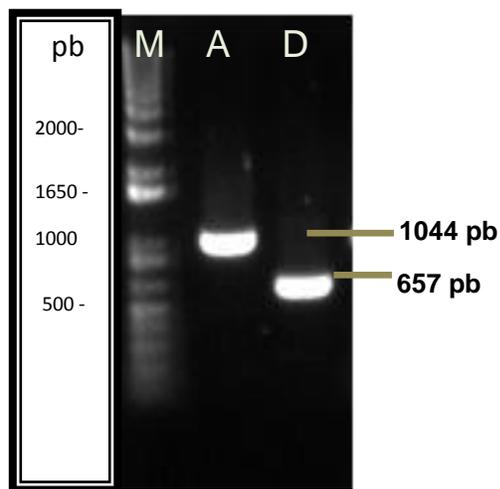


Figura 4. Producto de amplificación de PCR múltiple Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Cepa de Referencia A, (D) Cepa de Referencia D

Por medio de la PCR múltiple, en las cepas se logró la amplificación de un producto de ~1044 pb, en el 100% de las cepas (n=32) que corresponde al grupo capsular A de *P. multocida* (Figura 5).

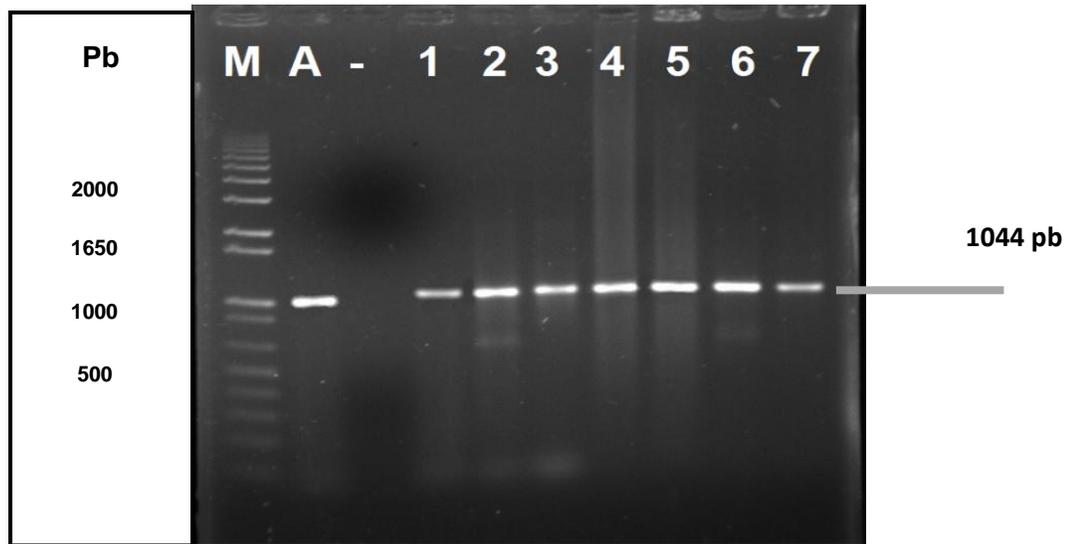


Figura 5. Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado faríngeo de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Control positivo A, (-) Control negativo, carriles 1-7 cepas de campo.

Los resultados de las amplificaciones de las 32 muestras analizadas presentaron el mismo perfil a las de la figura 5.

FRECUENCIA DE *P. MULTOCIDA* EN BOVINOS DESTINADOS A LA PRODUCCIÓN DE CARNE CLÍNICAMENTE SANOS.

Con base en los resultados obtenidos en la identificación bioquímica y molecular la frecuencia estimada de *P. multocida* fue de 14.09 % (32/227) de las cuales el 100% (32/32) fueron grupo A.

DISCUSIÓN.

El CRB ha sido reconocido como una enfermedad de gran importancia económica en el ganado. Su confirmación es difícil debido a la variedad en los signos clínicos y los procedimientos para su diagnóstico pueden tomar mucho tiempo. Los agentes bacterianos son los patógenos más comúnmente involucrados, actualmente no existe una prueba eficaz y sencilla para determinar la etiología de la enfermedad.^{1, 33, 34}

Se ha demostrado que las principales bacterias encontradas en los problemas respiratorios en el ganado bovino son *M. haemolytica*, *H. somni* y *P. multocida*, esta última se cita como la bacteria más comúnmente aislada en las neumonías de becerras lecheras,^{35,36} lo cual refleja en alguna medida la naturaleza oportunista de este microorganismo, al superar el desarrollo de otras bacterias.^{37,38,39} Se han identificado a los grupos capsulares A y D de *P. multocida*, como los responsables de ocasionar la pasteurelosis neumónica en México.^{7,22,40} En estudios llevados a cabo en el país con muestras pulmonares provenientes de rastros se han logrado aislamientos de *Pasteurella* spp en alrededor del 50% de los casos, en los que *P. multocida* ha sido el principal agente patógeno identificado.^{41,42,45}

El diagnóstico de *P. multocida* se ha basado tradicionalmente en la presencia de signos clínicos y la presentación de características fisicoquímicas del agente. Las pruebas se realizan con base en características fenotípicas; sin embargo, las condiciones del cultivo pueden influir en la expresión de las propiedades de la bacteria y con ello disminuir la especificidad y sensibilidad de los métodos basados en estas características.

La identificación fenotípica de las cepas se llevó a cabo mediante el método de siembra y crecimiento en agar sangre a 37 °C e identificando la morfología de la colonia.

Para la identificación bioquímica de *P. multocida* se dispone de métodos que se basan en sistemas comerciales miniaturizados, los cuales facilitan y agilizan la tipificación, entre ellos se encuentra el sistema API 20NE, el cual se ha empleado

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*.⁴² El sistema API es capaz de identificar con precisión *P. multocida* con un 64% menos del tiempo en comparación con otros sistemas como Oxi/Ferm. El porcentaje de errores de identificación es de sólo 10% en los aislamientos de *P. multocida*.^{42,43,44}

En los resultados obtenidos mediante el uso de este sistema se observó un alto porcentaje de identificación y tipicidad completa a *P. multocida* en el 100% de los aislamientos. Al utilizar el sistema API 20NE, se logró identificar 32 cepas (14.09%) como *P. multocida*, las cuales mostraron un porcentaje de identificación del 96% y tipicidad de 1 a *P. multocida*, se observaron 12 cepas (5.28%) con porcentajes de identificación y tipicidad menores al 96% y 1, respectivamente. 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* (2011), quienes en el 97.5% de las cepas analizadas encontraron un porcentaje de identificación del 96% y tipicidad de 1 a *P. multocida*, por lo cual se considera al sistema de identificación API 20NE como un método fácil de aplicar y de alta confiabilidad para la identificación de este microorganismo.

Se ha observado que la detección de *P. multocida* se realiza en una menor cantidad de tiempo utilizando la técnica de PCR. Con la identificación de los genes implicados en la biosíntesis del polisacárido capsular, las secuencias específicas de los grupos capsulares son identificadas para su utilización como iniciadores para la tipificación capsular *P. multocida* por Townsend *et al*, (2001).³⁰ La PCR puede ser realizada a partir de una colonia bacteriana o mediante la extracción de ADN por ebullición, lo que reduce el tiempo para la tipificación sin necesidad de la extracción del ADN bacteriano por métodos más costosos o con mayor inversión de tiempo, como en el caso de la lisis alcalina. La PCR dirigida a los genes *hya-C* y *-hyaD* proporciona una detección específica de las cepas de *P. multocida*.^{33,34}

Las ventajas de la PCR en comparación con otras pruebas existentes incluyen una mayor velocidad, sensibilidad, especificidad y simplicidad. No requiere medios de cultivo especiales ni la inoculación de animales de laboratorio y, por tanto, es más segura ya que evita el manejo de bacterias vivas.³³

En el país no existen antecedentes sobre las frecuencias de aislamiento de *P. multocida* en bovinos productores de carne; las frecuencias del presente trabajo (14.09%), de las cuales el 100% fue identificada como grupo capsular A, son similares a otros autores que han identificado al grupo A en porcentajes que van de un 80 hasta un 100%.³⁰ Trabajos similares se han realizado en ovinos, becerras y ganado lechero donde el grupo capsular más frecuentemente encontrado es el A con porcentajes que van desde 77 hasta 97.3%^{12,35} mientras que del grupo capsular D el intervalo es de 0.02 hasta un 27%.^{45,46,47} Yates (1982) menciona que el tipo A está asociado comúnmente con la neumonía en bovinos, mientras que el grupo D sólo se encuentra esporádicamente en casos de enfermedad respiratoria.⁴⁸

En otros informes basados en la caracterización fenotípica de las cepas de *P. multocida* de origen bovino y otros rumiantes, el grupo capsular predominante es el A.⁴⁹ Investigaciones realizadas en bovinos con muestras de pulmones neumónicos de becerras Holstein en el Estado de México,⁴⁷ y en pulmones neumónicos en los estados de México y Durango, informaron la presencia del grupo A en un intervalo de 98.7 a 100% de las muestras estudiadas y 1.2 % para el grupo D.^{45,47} Blanco *et al.* (1981) indicaron la presencia del grupo A en el 100% de los aislamientos de *P. multocida* en pulmones con lesiones neumónicas provenientes becerras en el Estado de México.⁴¹

En el presente estudio la totalidad de los aislamientos de *P. multocida* corresponden al grupo capsular A, dichos resultados demuestran que este grupo predomina en los bovinos clínicamente sanos destinados a la producción cárnica y se asemejan a los resultados obtenidos en el trabajo de Campuzano *et al.* (2011) en el que se utilizaron muestras de exudado nasal de bovinos lecheros clínicamente sanos procedentes de la región lagunera en los estados de Coahuila

y Durango, y en el estado de Hidalgo,²² con lo cual se corrobora que, de manera similar a otros países de Europa y América, en México el grupo capsular predominante de *P. multocida* es el A.

La identificación y caracterización de los grupos capsulares de *P. multocida* es importante en la prevención y tratamiento de la pasteurelisis neumónica en bovinos destinados a la producción de carne. Así como para conocer la situación epidemiológica de este microorganismo en el municipio de Ezequiel Montes, en el estado de Querétaro. De igual forma puede contribuir al desarrollo de inmunógenos más eficaces y como apoyo en los programas de prevención y control de dicha enfermedad.

Es menester resaltar que no existen datos similares en México sobre la identificación y caracterización de *P. multocida* en bovinos especializados en la producción de carne.

CONCLUSIONES.

- Se confirmó la presencia de *P. multocida* en exudado faríngeo proveniente de bovinos de engorda clínicamente sanos.
- No existen datos similares en México sobre la identificación y caracterización de *P. multocida* en bovinos especializados en producción de carne.
- El grupo capsular A de *P. multocida* es el que predomina en los bovinos clínicamente sanos.
- El microsistema API20NE es una herramienta eficiente que acorta el tiempo de identificación de *P. multocida*.
- La prueba de PCR, es una herramienta rápida de detección e identificación para el diagnóstico rutinario de la pasteurelisis neumónica.
- Es necesario analizar un mayor número de muestras de distintas producciones en diferentes zonas del municipio y del estado, para conocer la situación de *P. multocida* a nivel estatal.

REFERENCIAS

1. COOPER V.L. BRODERSEN B. W. Bovine Respiratory Disease. Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice. 2010; 26:191-426.
2. LILIE L.E. The Bovine Respiratory Disease Complex. The Canadian Veterinary Journal. Symposium on Immunization of Cattle Against the Common Diseases of the Respiratory Tract. La revue de veterinaire canadienne 1974; 15:233-42.
3. TRIGO TJF, GONZÁLEZ RT. Avances sobre la patogenia de la neumonía bovina producida por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Disponible en: ammveb.net/XXVI%20CNB/memorias/mag/docs/mag03.doc Citado diciembre 2011.
4. TRIGO TF. Patología sistémica. Cuarta edición. McGraw Hill. México, 2010. 62-63.
5. JARAMILLO ACJ, TRIGO TFJ, SUÁREZ GF, Mannheimiosis Bovina: Etiología, Prevención y Control. Vet Méx 2009; 403:293-311.
6. BOYCE RY, WILKIE I, ADLER B. *Pasteurella and Mannheimia* In: Gyles CL, Prescott JF. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa: Third edition. Blackwell Publishing 2007; 1: 273-270.
7. TRIGO TFJ. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pastereurelosis pulmonar bovina. Vet Mex 1991; 2:131-34.
8. ELLIS JA. Update on viral pathogenesis in BRD. Anim Health Res 2009; 10:149-153.
9. CUSACK PMV, McMENIMAN N, LEAN IJ. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. Australian Veterinary Journal 2003; 81:480-487.
10. HARPER M. BOYCE D. ADLER B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. Australian Research Council Centre of Excellence in Structural and Functional Microbial Genomics. Department of Microbiology. Monash University 2006; 265:1-10.

11. CONFER AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res* 2009; 10:145-151.
12. VIDHYA M. CHANDRAN D.J. MANOBAR P. DHINAKAR R. Molecular identification of serogroups of *Pasteurella multocida* Isolated from sheep by capsular PCR typing. *Tamilandy J. Veterinary and animal sciences*; 2007;3:140-143.
13. CUETO LM, PASCUAL HA. *Pasteurella multocida*. Departamento de microbiología. Hospital universitario Virgen Macarena. Sevilla. Disponible en: <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/pmultocida.pdf> Citado enero de 2013.
14. BOYCE JD. JING YC. ADLER B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *Journal of Biotechnology* 2000; 83:153-160.
15. DWIGHT CH, YUAN CZ. *Veterinary microbiology*. Iowa. Blackwell Publishing 2010; 1: 273-278.
16. CARTER GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. *Adv Vet Sci* 1967; 11:321-379.
17. ÓBICE JD, ADLER B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 2000; 68:3463-3468.
18. GONZÁLEZ RAD. Identificación Molecular de *P. multocida* de origen bovino, mediante la técnica de los genes *hyaD*, *hyaC* y *dcbF* del operón capsular (tesis de licenciatura) México. FMVZ, UNAM 2008.
19. BOSCH GM. Caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *Pasteurella multocida*. Disponible en: http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/TDX-1222103-150439/mbg1de1.pdf. Citado enero de 2011.
20. CARMEL G. Identification, Purification, and Characterization of the Type 4 Fimbriae of *Pasteurella multocida*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC174600/pdf/650339.pdf> Citado febrero 2011.

21. SLEIM RS. Review: major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. Disponible en [http:// www.priory.com/vet/pasteurella.htm](http://www.priory.com/vet/pasteurella.htm) Citado enero de 2011.
22. CAMPUZANO OVM, GONZÁLEZ RAD, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF, TRIGO TFJ, JARAMILLO ACJ. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Pasteurella multocida* de exudado nasal en bovinos, en dos cuencas lecheras de México. *Vet Mex* 2011; 1:1-10.
23. CARTER GR, SUBRONTA P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavin. *Am J Vet Res* 1973; 34:293-294.
24. CARTER GR, RUNDELL SW. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidasa. *Vet Rec* 1975; 96:343.
25. BOYCE JD, CHENG J Y, ADLER B. Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M104 (B:2). *Vet Microbiol* 2000; 72:121-34.
26. HUNT ML, ADLER B, TOWNSEND KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 2000; 72:3-25.
27. CATRY B, BAELE M, OPSOMER G, KRUIF A, DECOSTERE A, HAESBROUCK F. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. *Vet Microbiol* 2004; 98:251-260.
28. MAY BJ, ZHANG Q, LI LL, PAUSTIAN ML, WHITTAM TS, KAPUR V. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:3460-3465.
29. WASSENAAR TM, GAASTRA W. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* 2001; 201:1-7.
30. 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.
31. CHUNG JY, ZHANG YM, ADLER B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiol. Lett* 1998; 166:289-296.

32. OBERHOFER T.R. Characteristics and biotypes of *Pasteurella multocida* isolated from humans. JCM 1981; 3:566-571.
33. SZABO I, UDA H, SAKAMOTO H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. Clin Pathol 1994; 47:318-323.
34. RAJEEV G, KUMAR A, SINGH VP, VIJENDRA P. SINGH, T.K. DUTTA, S.B. Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. Division of Bacteriology and Mycology, Indian Veterinary Research Institute, Veterinary science 2004; 76:179-185.
35. D. C. DEROSA,¹ G. D. MECHOR,¹ J. J. STAATS,² M. M. CHENGAPPA. Comparison of *Pasteurella* spp. Simultaneously Isolated from Nasal and Transtracheal Swabs from Cattle with Clinical Signs of Bovine Respiratory Disease. Elanco Animal Health, Greenfield, Indiana 46140,¹ and Kansas State University. JCM 2000; 38:327-332.
36. GOURLAY RN, THOMAS LH, WYLD SG. Experimental *Pasteurella multocida* pneumonia in calves. Res Vet Sci 1989; 47:185-189.
37. VIRTALA AMK, MECHOR GD, GROHN YT, ERB HN, DUBOVI 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; 208:2035-2042.
38. AMES TR. Dairy calf pneumonia. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1997; 13:379-391.
39. AMES TR, MARKHAM RJF, OPUDA-ASIBO J, LEININGERJR, MAHESWARAN SK. Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. Can J Comp Med 1985; 49:395-400.
40. 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 (tesis de licenciatura) FMVZ-UNAM 2007.

41. TRIGO TF, HERNÁNDEZ LG, RAMÍREZ CC, BERRUECOS VM. Patología y bacteriología de pulmones neumónicos de becerros. Vet Méx 1982; 13:131-140.
42. BLANCO-VIERA FJ, TRIGO FJ, JARAMILLO ML, AGUILAR RF. 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.
43. 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.
44. COLLINS MT, WEAVER N, ELLIS RP. Identification of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* by API 20E, Minitek, and Oxy/ferm systems. Journal of clinical microbiology 1981; 13:433-437
45. JARAMILLO ACJ, HERNANDEZ CR, CAMPUZANO OV, SUÁREZ GR, DELGADO GR, TRIGO TF. Characterization of *Mannheimia* sp. And *P. multocida* strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico. Journal of animal and veterinary advances 2007; 12:1384-1403.
46. DE LA ROSA RJL, JARAMILLO ACJ, MARTÍNEZ MJJ, AGILAR RF, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF, TRIGO TF. Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en becerras con signos clínicos de enfermedad respiratoria, en un complejo lechero del estado de Hidalgo, México. Vet Méx; 12;43:1-10.
47. JARAMILLO CL, AGUILAR RF, TRIGO TF. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. Vet Méx 1987; 18:185-188.
48. YATES WDG. A review of infectious bovine rhynotracheitis, shipping fever pneumonia and viralbacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can J Comp Med 1982; 46:225-263.

49. TRIGO TFJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos.
Cien Vet 1987; 4:1-37.