



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE LOS SEROTIPOS DE *Mannheimia sp.*  
AISLADOS DE EXUDADO NASAL DE CAPRINOS EN EL  
ALTIPLANO DEL ESTADO DE QUERÉTARO

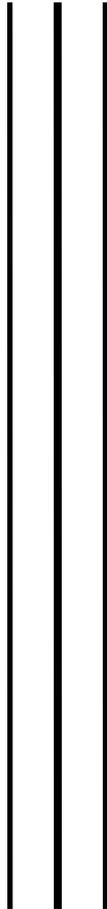
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**ARELI LILIANA PANIAGUA TORRES**



Asesores:

Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango

M en C. Víctor Manuel Campuzano Ocampo

México, D.F.

2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca y las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo a través del proyecto CB-104031.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano de la FMVZ. UNAM.

Al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la FMVZ. UNAM.

A la Dra. Laura Jaramillo Meza del CENID- Microbiología, INIFAP.

A mis asesores: Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango y M en C. Víctor Manuel Campuzano Ocampo por su gran apoyo, consejos y conocimientos aportados.

A mi madre y abuela, por su gran amor, paciencia y sacrificios.

A Fabiola, Rocío y todos los grandes amigos del anexo de medicina preventiva por estar a mi lado incondicionalmente.

A ti, amor de mi vida, por ayudarme a crecer.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1.Historia .....	6
1.2. Perspectiva mundial .....	7
1.3. Perspectiva nacional .....	8
1.4.Mannheimiosis .....	9
1.5.Características generales de <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	12
1.6.Factores de virulencia .....	13
1.6.1.Leucotoxina .....	13
1.6.2.Lipopolisacárido .....	14
1.6.3.Factores de virulencia .....	15
1.7.Identificación de <i>M. haemolytica</i> .....	16
2. HIPÓTESIS .....	17
3. OBJETIVO GENERAL.....	17
3.1.Objetivos particulares .....	17
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	18
4.1. Toma de muestras .....	18
4.2. Aislamiento de <i>Mannheimia sp.</i> .....	19
4.3. Identificación del agente .....	20
4.4.Tipificación serológica .....	20
4.4.1. Crecimiento de cultivo de <i>M. haemolytica</i> .....	20
4.4.2. Preparación del antígeno .....	20
4.4.3. Preparación de eritrocitos .....	21
4.4.4. Sensibilización de eritrocitos .....	21
4.4.5. Preparación de las placas y carga del antisuero .....	21
4.4.6. Desarrollo de la prueba .....	21
4.5.Análisis de la información .....	22
4.5.1. Tasa de prevalencia .....	22
4.5.2. Análisis estadístico .....	22

5. RESULTADOS .....	23
5.1. Aislamiento de <i>Mannheimia sp.</i> .....	23
5.2. Identificación del agente .....	24
5.3. Tipificación serológica .....	25
5.4. Prevalencia de <i>M. haemolytica</i> y sus serotipos en caprinos del CEIEPAA .....	26
5.5. Análisis estadístico .....	27
6. DISCUSIÓN .....	28
7. CONCLUSIONES .....	32
BIBLIOGRAFÍA .....	33

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar los diferentes serotipos de *Mannheimia sp.* en aislamientos provenientes de exudados nasales de caprinos en el Centro de Investigación, Enseñanza y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM ubicado en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México; con una población de 250 caprinos, en diferentes etapas de producción. Se tomaron muestras de exudado nasal colectadas con hisopos estériles colocados en medio de transporte Stuart. Las muestras se inocularon en placas de agar sangre, se incubaron a 37 °C durante 24 horas, se seleccionaron colonias sugerentes a *M. haemolytica* y se realizó la tinción de Gram, seleccionando las que cumplieron las características morfológicas. La identificación de *M. haemolytica* se efectuó utilizando el sistema API 20NE. Para la determinación del serotipo de los diferentes aislamientos se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación con antisueros específicos contra antígenos capsulares de *Mannheimia sp.* Se obtuvieron 54 aislamientos (21.6%) sugerentes a la morfología típica de *M. haemolytica* y de ellos se identificaron 56% (15/27) como cultivos de *M. haemolytica*, de los cuales 12 (80%) correspondieron al serotipo A7 y 3 (20%) fueron no tipificables. La población muestreada para esta investigación estaba conformada en su mayoría (42%) por animales menores a 1 año de edad, sin embargo, de los individuos dentro de este grupo solo se obtuvo el 13% de los aislamientos, mientras que el 60% de los aislamientos correspondieron a caprinos de 6 años de edad. Se encontró diferencia significativa entre la prevalencia de los aislamientos de *M. haemolytica* con respecto a los grupos etarios de la población en estudio. ( $p < 0.05$ )

Palabras clave: *Mannheimia haemolytica*, serotipos, exudado nasal, caprinos, Querétaro, México.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Historia

La cabra fue uno de los primeros rumiantes en ser domesticado y con mayor distribución en el mundo. Algunos estudios revelan que su domesticación data de hace más de 10,000 años y existe evidencia de que se consideraba una especie animal de relevancia comercial desde tiempos de la antigua Mesopotamia y una de las más útiles al ser humano, sobre todo como proveedora de leche y carne. Fue introducida al Caribe en el siglo XVI por los españoles y posteriormente comenzaron a distribuirse en el continente americano.<sup>1</sup>

México cuenta con el segundo inventario caprino más grande del continente americano, con aproximadamente 9 millones de animales. La caprinocultura ha sido una actividad importante en el país desde la época de la colonia, su desarrollo ha estado orientado principalmente a la producción cárnica; sin embargo, en los últimos años, la producción lechera ha evolucionado notablemente debido al aumento en el apoyo e incentivos a la producción, que ha facilitado el impulso de la producción de dulces tradicionales, la elaboración de quesos artesanales y el fomento de la producción tecnificada de subproductos.<sup>1-3</sup>

Conforme a las costumbres de consumo en México existen diferentes sistemas de producción encaminados a satisfacer las demandas de un público cada vez más exigente. En las áreas cercanas a los centros urbanos, predomina la producción de leche, la cual se comercializa tanto en forma fluida como transformada; entre estos tipos de producción se acostumbra la venta del “cabrito” que es un animal que ha alcanzado los dos meses de edad y se ha alimentado exclusivamente de leche materna. Por otro lado, mientras más alejadas están las explotaciones de los centros urbanos, el sistema imperante es la venta de animales adultos, o bien, para autoconsumo. En otras regiones la comercialización de los animales jóvenes es el sistema establecido, por lo cual predomina la producción de carne.<sup>3, 4</sup>

## 1.2. Perspectiva mundial

Actualmente, se estima que existe una población mundial de alrededor de 780 millones de cabras las cuales se encuentran distribuidas de la siguiente manera: 55.4% en Asia, 29.8% en África, 7.3% en Sudamérica, 4.4% en Europa, 3% en Norte y Centroamérica, 0.1% en las Islas del Pacífico.<sup>1, 5</sup>

Los países con mayores poblaciones caprinas son China con el 20.61% de la población mundial, India con el 17.08%, Pakistán con el 6.58%, Sudán con el 5.25%, México representa el 1.33% del total mundial. Las cabras aportan el 6% de la producción de carne total mundial, el 2% de la leche y el 4% de las pieles. La mayor parte de la producción caprina se destina al autoconsumo; por lo que las cabras tienen mayor relevancia en la alimentación de las poblaciones rurales a nivel mundial, mayor que el de las especies bovina y ovina.<sup>1, 5</sup>

El principal activo de la producción caprina comercializado a nivel mundial es la venta de los animales vivos y el producto con mayor demanda en el mercado es el queso, siendo los principales países consumidores Estados Unidos, Canadá, México y Japón. Por otra parte, Francia, Holanda y España son los principales proveedores mundiales.<sup>1, 5</sup>

Francia es considerada como el país líder tanto en materia de tecnología, como de producción de quesos. Sus productos tienen denominación de origen controlada con prestigio a nivel mundial. Otros subproductos obtenidos de la crianza caprina que se comercializan de manera regular, son la fibra mohair y cuero de cabra.<sup>6</sup>

### **1.3. Perspectiva nacional**

La producción caprina en México aporta el 1% del valor de la producción pecuaria nacional y es una fuente importante de ingresos de productores de bajos recursos en zonas marginadas.<sup>3,7</sup>

El 75 % de los caprinos en el país se producen bajo un sistema extensivo, en el que los animales se utilizan para la producción cárnica por lo que la obtención de leche se da de manera ocasional (regularmente para el autoconsumo). La leche caprina representa el 5% de la producción láctea nacional. Gran parte de este volumen se destina a la industria manufacturera de dulces, quesos y otros productos.<sup>2,3</sup>

En México se tienen registradas 494,000 unidades de producción caprina y aproximadamente 1.5 millones de mexicanos tienen como actividad productiva primaria o complementaria a la caprinocultura. El 64% de las cabras se concentra en los sistemas de producción característicos de las zonas áridas y semiáridas y el 36% restante, en la región templada del país. Así, la caprinocultura genera anualmente cerca de 43,000 toneladas de carne y más de 160 millones de litros de leche (alrededor de 400 gramos de carne y 1.53 litros de leche anuales per cápita), más del 70% es producido en los sistemas extensivos de las zonas áridas y semiáridas, y aproximadamente el 25% en los sistema intensivos de leche son de cabra.<sup>1, 3, 4, 7</sup>

Los estados con mayor población caprina son: Puebla con el 15.17 %, Oaxaca con el 13.41%, Guerrero con el 7.36%, Coahuila con el 7.31%, San Luis Potosí con 6.87% y Guanajuato 6.35%. Dentro de los estados con mayor producción de leche, sobresalen Coahuila con el 35.68 % del total nacional, Durango 21.02%, Guanajuato 15.43%, Chihuahua 6% y Jalisco 4.48%.<sup>2</sup>

La producción caprina nacional se enfrenta a varias limitantes como la carencia de infraestructura, costos de producción altos y rezago tecnológico y sanitario en

donde se destaca la presentación de diferentes enfermedades sobre todo aquellas que afectan el sistema respiratorio. Las neumonías representan uno de los mayores problemas de la producción de pequeños rumiantes alrededor del mundo, causando elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Los microorganismos de la familia *Pasteurellaceae*, representan uno de los grupos bacterianos con mayor frecuencia identificados en procesos neumónicos de los animales domésticos, siendo *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* las bacterias con mayor frecuencia de aislamientos en rumiantes, principalmente en corderos, terneros y cabritos. *Mannheimia haemolytica*, frecuentemente es asociado en la presentación de neumonías en cabras adultas ocasionando mermas a la producción y en el caso específico de producción bovina se estiman pérdidas económicas hasta por un billón de dólares anuales en los Estados Unidos de América.<sup>8-11</sup>

En el ámbito nacional, la mayoría de las investigaciones en caprinocultura abordan aspectos como la tecnificación para la producción láctea o tecnologías para mejoras en parámetros reproductivos como por ejemplo la transferencia de embriones, la superovulación, sincronización de estros, entre otras; lo que ha provocado un rezago en la investigación del impacto que las enfermedades del tracto respiratorio tienen en la producción caprina.<sup>3, 8</sup>

#### **1.4. Mannheimiosis**

*M. haemolytica* es una bacteria que habita de forma natural como comensal del tracto respiratorio superior y nasofaringe de los rumiantes. Regularmente mantiene una relación simbiótica con el hospedero, sin embargo factores como infecciones virales primarias o condiciones medioambientales que generen estrés, la convierten en uno de los agentes causales más importantes de enfermedad en procesos respiratorios comúnmente encontrados en producciones de rumiantes. Estos factores predisponentes provocan inmunosupresión en el hospedador induciendo su proliferación en el tracto respiratorio, así como su colonización y

establecimiento provocando posteriormente una infección pulmonar, lo que produce lesiones que se encuentran con mayor frecuencia en los lóbulos craneoventrales y se caracterizan por una infiltración de neutrófilos y exudado de fibrina en las vías respiratorias y alveolos. Se asocia comúnmente con la enfermedad conocida como pasteurelisis neumónica, la cual tiene una importante relevancia en términos económicos para la producción bovina ya que ocasiona estados debilitantes con altas tasas de morbilidad y mortalidad.<sup>11-16</sup>

Su patogénesis involucra muchos agentes predisponentes como virus, otras bacterias, cambios bruscos de temperatura, estrés asociado a manejo como el destete, descorné, cambio en la alimentación y transporte. Estos factores alteran el epitelio del tracto respiratorio superior permitiendo la colonización de *M. haemolytica* y el movimiento de la bacteria de la nasofaringe a los pulmones produciendo un tipo de neumonía bronco alveolar caracterizada por alta morbilidad (19%) y mortalidad (11%). *M. haemolytica* en asociación con *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mycoplasmas arginini* y *Pasteurella multocida* presentan una mortalidad mayor del 20% en cabritos. Agentes causales de problemas respiratorios como el virus de la Parainfluenza tipo 3, adenovirus tipo 6 y virus respiratorio sincitial, tienen la característica de replicarse rápidamente en la nasofaringe incrementando considerablemente la susceptibilidad de ovinos y caprinos a una infección secundaria por *M. haemolytica* y *P. multocida*.<sup>13, 17, 18</sup>

Infecciones pulmonares agudas causadas por *M. haemolytica* se caracterizan por una respuesta con presentación aguda a hiperaguda fibrinosupurativa, inflamación y necrosis. Horas después de la infección, el pulmón, bronquios, bronquiolos y alveolos contienen una alta densidad de infiltración de neutrófilos, fibrina, fluido seroprotéico y sangre. El exudado está asociado con la extensa necrosis del parénquima, causada por productos de *M. haemolytica* como leucotoxina, lipopolisacárido, polisacárido y factores inflamatorios liberados por neutrófilos y otras células del proceso inflamatorio.<sup>10, 13</sup>

Durante las primeras 24 horas de infección, neutrófilos y monocitos salen del sistema circulatorio y migran al lugar de la infección. Los 4 a 7 días postinfección son críticos para el establecimiento de la infección y una buena actividad fagocitaria en este tiempo determina la extensión de las lesiones pulmonares futuras. Los macrófagos alveolares son considerados como las principales células fagocíticas del mecanismo de defensa pulmonar y representan la primera línea de defensa contra la pasteurelisis neumónica. Además durante la neumonía causada por *M. haemolytica* se presenta una infiltración de exacerbada neutrófilos. Por lo tanto, existe una correlación entre la extensión de las lesiones pulmonares y la actividad fagocítica.<sup>15, 18</sup>

Las lesiones pulmonares son lobulares, localizadas con mayor frecuencia en los lóbulos apical y cardiaco, caracterizadas por una infiltración de neutrófilos extendida y exudado fibrinoso en las vías respiratorias y alveolos. En los alveolos se observan áreas de necrosis coagulativa multifocal originada por la citólisis de neutrófilos y macrófagos que vierten una gran variedad de compuestos tóxicos *in situ* agravando el daño pulmonar. Los pulmones de los rumiantes tienen características anatómicas que limitan su capacidad para resolver episodios neumónicos debido a que las unidades alveolares tienen una ventilación colateral reducida la cual disminuye más con la presencia de exudado o líquido.<sup>10, 13, 15, 16</sup>

Los animales con infección causada por *M. haemolytica* muestran los siguientes signos: fiebre, descarga nasal, tos, dificultad respiratoria, falta de apetito y pérdida de peso.<sup>18</sup>

La frecuencia de *M. haemolytica* reportada en pulmones neumónicos ha sido de 32.4 a 75%. En estudios previos, *M. haemolytica* fue detectada en un 38% usando cultivos bacterianos y en estudios de inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales fue de 45%.<sup>13</sup>

## 1.5. Características generales de *Mannheimia haemolytica*

*M. haemolytica* pertenece a la familia *Pasteurellaceae* en la cual se incluyen los géneros *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Lonepidella*. A través del tiempo ha pasado por varias clasificaciones; en 1885 fue nombrada *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt. Más tarde, en 1896, Flugge lo modificó a *Bacillus bovisseptica* y en 1932, Newson y Cross, la renombraron *Pasteurella haemolytica* debido a la débil hemólisis observada en las cajas de agar de sangre de ovino y la clasificaron en 16 serotipos. Smith la dividió en 2 biotipos: A y T, con base en su capacidad para fermentar la arabinosa y la trehalosa respectivamente. En 1999, utilizando datos de ribotipificación, electroforesis de enzimas multilocus, comparación de las secuencias 16S ARNr e hibridación ADN-ADN los serotipos A de *P. haemolytica* fueron reclasificados en un nuevo género *Mannheimia*, constituido por 5 especies: *M. haemolytica* que comprende los serotipos A1, A2, A5, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17, se limita principalmente a los rumiantes y es el agente más importante involucrado en las neumonías en bovinos y ovinos, siendo los serotipos A1 y A2 los más prevalentes en el mundo. *M. glucosida*: (Biotipos 3 A-H y 9, y serotipo 11) aislada con mayor frecuencia de la cavidad nasal de ovinos causando neumonías. *M. granulomatis*: (taxón 18 y un biotipo 8D) aislada de conejos, liebres y rara vez encontrado en ganado, asociado a neumonía, conjuntivitis purulenta en los lepóridos y granulomas en la piel junto con otras condiciones de enfermedad en el ganado. *M. ruminalis*: (taxón 20 y un biotipo 3J) aislada de rumen de bovinos y ovinos, no ha sido asociada a enfermedad. *M. varigena*: (biogrupo 6 y taxón 15, 36) aislada en bovinos y cerdos causando principalmente neumonía y sepsis.<sup>19-21</sup>

*M. haemolytica* es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no esporulada, inmóvil, de forma coco bacilar de 1 a 3 µm de diámetro, mesofílica, aerobia y anaerobia facultativa, oxidasa positiva e indol negativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas. Crece en agar MacConkey, en medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre, formando colonias lisas de color blanco grisáceo, con tamaños de 1 a 2 mm de diámetro después de 24

horas de incubación. La mayoría de las cepas producen una  $\beta$ -hemólisis cuando crecen en agar sangre. La presencia de cápsula la hacen parcialmente resistente a la fagocitosis.<sup>12, 19</sup>

## **1.6. Factores de virulencia**

Se han identificado diversos factores de virulencia en *M. haemolytica*, los cuales incluyen: leucotoxina (Lkt) con actividad específica contra leucocitos; lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PRH), fimbrias, enzimas (neuraminidasa, proteasas, metaloglicoproteasas), antígenos aglutinantes serotipo específico y adhesinas; además de cápsula y plásmidos de resistencia a antibióticos. Todos estos mecanismos juegan un papel fundamental de la patogénesis de la enfermedad; sin embargo, sólo la Lkt y el LPS se consideran como factores de patogenicidad primarios.<sup>16, 19</sup>

### **1.6.1. Leucotoxina**

La Lkt es una toxina calcio dependiente que es producida durante la fase logarítmica del crecimiento de la bacteria y es considerada el principal factor de virulencia de *M. haemolytica* ya que tiene actividad específica contra leucocitos de rumiantes y es la principal causante del daño al pulmón.<sup>18,19</sup>

Esta toxina es producida y secretada por todas las cepas aunque puede observarse variación en la cantidad producida entre cada una de ellas, su efecto tóxico es específico en especial contra las células polimorfo nucleares.<sup>19, 22</sup>

La actividad fagocítica es menos eficiente en infecciones por *M. haemolytica* debido a la producción de leucotoxina. Estudios han mostrado que la leucotoxina causa cambios degenerativos en los macrófagos alveolares y reduce su actividad fagocítica.<sup>9, 15, 16</sup>

Su actividad es dosis-dependiente, a bajas concentraciones causa la muerte celular mediante apoptosis, mientras que a altas concentraciones causa muerte por oncosis.<sup>22</sup>

La Lkt juega un papel muy importante en la patogénesis de la infección al destruir leucocitos, principalmente macrófagos alveolares, en el sitio de infección lo cual reduce la capacidad del huésped de establecer una respuesta inmune eficiente.<sup>12</sup>

### **1.6.2. Lipopolisacárido**

Las bacterias Gram negativas, producen LPS como parte de la capa externa de sus paredes celulares, estas sustancias son denominadas endotoxinas. Constan de tres regiones estructurales: Polisacárido O (la parte más externa), un núcleo del polisacárido y el Lípido A. De estas regiones la más importante es el polisacárido O en procesos de tipificación.<sup>12, 19</sup>

El LPS es uno de los componentes con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria; como toda endotoxina de bacteria Gram negativa tiene actividad pirogénica, de activación de macrófagos, inducción del factor de tumoración, activación de la cascada de coagulación, agregación de plaquetas e inducción de choque endotóxico. También interviene en la respuesta de anticuerpos, en la protección antibacteriana y en adhesión a las células del hospedador. En los bovinos se ha observado que tiene un efecto apoptótico directo sobre el endotelio alveolar de los pulmones de bovino y aumenta la actividad de la leucotoxina formando un complejo LPS-Lkt.<sup>10, 12, 19</sup>

Las lesiones que induce el LPS consisten en grandes áreas de hiperemia y edema que abarcan zonas de deposición de células inflamatorias invadiendo en ocasiones los lóbulos pulmonares adyacentes, además también pueden observarse focos de hemorragia y adherencia fibrinosa.<sup>10,19</sup>

### 1.6.3. Otros factores de virulencia

Las PME externa tienen una participación potencial en la respuesta de anticuerpos, en la protección antibacteriana y en la adhesión a los leucocitos. Son importantes antígenos que estimulan la respuesta inmune y potenciales inmunógenos para el desarrollo de vacunas, observándose variaciones inmunogénicas entre los diferentes serotipos de *M. haemolytica*.<sup>10, 19</sup>

Las PRH, se unen al hierro disponible y facilitan el crecimiento de la bacteria.<sup>19</sup>

Las fimbrias están involucradas en la adhesión bacteriana durante la fase de colonización en el tracto respiratorio superior y las adhesinas se encargan del reconocimiento y la unión a receptores de las células blanco.<sup>19</sup>

La sialoglicoproteasa tiene actividad de endopeptidasa y neuraminidasa. La neuraminidasa, alcanza su máximo pico de producción en la fase estacionaria y participa en la remoción de glicoproteínas de la superficie celular o del moco, facilitando la adherencia.<sup>19, 22</sup>

La cápsula se produce durante la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria, protegiéndola de la fagocitosis y de la actividad bactericida, además puede interactuar con el surfactante pulmonar facilitando la adherencia a las células del hospedador.<sup>19</sup>

El polisacárido capsular protege a *M. haemolytica* de los mecanismos de defensa naturales de los pulmones en la fase de colonización permitiendo a la bacteria replicar y producir leucotoxina.<sup>15, 19</sup>

El glucocalix participa en la adhesión de *M. haemolytica* a los leucocitos y causa un efecto citolítico en dichas células.<sup>19, 22</sup>

## 1.7. Identificación de *M. haemolytica*

La identificación y serotipificación del agente es de vital importancia para el control de una enfermedad, ya que permite la elección de un tratamiento específico a las serovariedades identificadas, mediante el conocimiento de los patrones de presentación obtenidos a través de los aislamientos pertenecientes a una misma región. Los métodos clásicos para identificar las bacterias se basan en las características observables en las cepas, con predecibles propiedades físicas y bioquímicas en condiciones de crecimiento óptimo. En la actualidad existen una gran variedad de metodologías, pruebas bioquímicas, inmunológicas y moleculares.<sup>23</sup>

El método convencional de identificación de *M. haemolytica* implica la utilización de una serie de pruebas bioquímicas que pueden realizarse de manera tradicional o mediante algún sistema comercial, como pueden ser las galerías multisustrato API (Analytical Profile Index) o Índice Analítico de Perfil.<sup>24</sup>

El API es un método para clasificar bacterias que permite la rápida identificación. Fue inventado en 1970 en los Estados Unidos por Pierre Janin de Analytab Products, Inc. Actualmente, el sistema de pruebas API es producido por bioMérieux. Este sistema introdujo una base estandarizada y miniaturizada de las pruebas bioquímicas existentes, que hasta entonces eran complicadas de realizar y de difícil interpretación.<sup>24</sup>

La galería API 20NE (identificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias) es un sistema de rápida identificación, a través del cual se combinan algunas pruebas convencionales y consiste en 20 pequeños tubos o pocillos con reactivos diagnósticos, los cuales incluyen un sustrato. Trabajos previos, como el de Jaramillo *et al.*, señalan la eficiencia del sistema de identificación bacteriana API para la caracterización de *Mannheimia spp.*<sup>11, 24</sup>

Para la tipificación serológica de *M. haemolytica* comúnmente se emplea la técnica de hemoaglutinación indirecta, descrita por Biberstein (1978), mediante la

utilización de antisueros de referencia específicos para los 12 serotipos reconocidos.<sup>19</sup>

## **2. HIPÓTESIS**

Es posible la identificación de *Mannheimia sp.* en el ganado caprino del Centro de Investigación, Enseñanza y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) y existen diferencias significativas entre los lotes de estudio.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar los diferentes serotipos de *Mannheimia sp.* en aislamientos provenientes de exudados nasales de caprinos en el CEIEPAA de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### **3.1. Objetivos particulares**

- Identificar los aislamientos correspondientes con la morfología de *Mannheimia sp.* en los caprinos del CEIEPAA.
- Caracterizar los diferentes serotipos de *Mannheimia sp.* aislados durante el estudio.
- Determinar la prevalencia de *Mannheimia sp.* en caprinos del CEIEPAA.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Toma de muestras

El muestreo se realizó en el Centro de Investigación, Enseñanza y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), ubicado en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México; con una población de 250 caprinos, en diferentes etapas de producción (Cuadros 1 y 2). Se tomaron muestras de exudado nasal colectadas con hisopos estériles colocados en medio de transporte Stuart para su posterior análisis.

**Cuadro 1. Características de la población en estudio según grupo etario y sexo**

Edad	Total		Hembras		Machos	
	Años	Número	Número	%	Número	%
≤ 1		104	83	37	21	78
2		45	44	20	1	4
3		21	19	9	2	7
4		20	18	8	2	7
5		11	11	5	0	0
6		44	43	19	1	4
≥ 7		5	5	2	0	0
<b>Total</b>		<b>250</b>	<b>223</b>	<b>100</b>	<b>27</b>	<b>100</b>

**Cuadro 2. Características de la población en estudio según raza**

<b>Raza</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Alpino Francés</b>	138	55
<b>Toggenburg</b>	56	23
<b>Saanen</b>	23	9
<b>Cruza</b>	20	8
<b>Boer</b>	13	5
<b>Total</b>	250	100

El procesamiento de las muestras se efectuó en el Laboratorio de Investigación II del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

#### **4.2. Aislamiento de *Mannheimia sp.***

Las muestras obtenidas fueron conservadas en refrigeración (4 °C) hasta el momento de su procesamiento.

Se conformó un cepario con los aislamientos que fueron obtenidos mediante la siembra en agar sangre por el método de estría cerrada, se incubaron a 37 °C de 18 a 24 horas, posteriormente, se seleccionaron a todas las colonias con morfología sugerente a *Mannheimia spp.* y fueron resembradas en agar sangre e incubadas durante 24 horas a 37 °C, obteniendo así la cepa en cultivo puro con la que se realizó la tinción de Gram, seleccionando las que cumplieron las características: Gram negativa y cocobacilar.

### **4.3. Identificación del agente**

La identificación de *M. haemolytica* se efectuó utilizando el sistema API 20NE, para la cual se realizó una suspensión del cultivo en 5 mL de solución estéril, con una densidad media de 0.5 en la escala de McFarland. La suspensión fue transferida a la galería e inoculada para ser incubada a 37 °C. La primera lectura se realizó a las 24 horas posteriores a la inoculación, la segunda lectura a las 48 horas de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Los resultados obtenidos del perfil de cada una de las cepas, se comparó con los archivos taxonómicos contenidos en la base de datos del programa APIWEB.<sup>a</sup>

### **4.4. Tipificación serológica**

Para la determinación del serotipo de los diferentes aislamientos se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación con antisueros específicos contra antígenos capsulares (1-17) de *Mannheimia sp.* mediante la siguiente metodología:

#### **4.4.1. Crecimiento de cultivo de *M. haemolytica***

Las cepas a serotipificar fueron resembradas en placas de agar sangre, después de 24 horas de incubación las bacterias se inocularon en tubos de 15 mL con caldo infusión cerebro-corazón (5mL) y se incubaron en agitación orbital a 37 °C toda la noche.

#### **4.4.2. Preparación del antígeno**

Los cultivos bacterianos se calentaron en “baño maría” con agitación a 56 °C durante 30 minutos con el fin de inactivar las bacterias y liberar los antígenos solubles capsulares en el medio.

---

<sup>a</sup> <http://www.biomerieux.com>

#### **4.4.3. Preparación de eritrocitos**

En un tubo “falcon” se colocaron 5 mL de sangre de bovino y se adicionaron 45 mL de PBS (1X), se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante. Este lavado se repitió 3 veces.

#### **4.4.4. Sensibilización de eritrocitos**

Al cultivo inactivado se le adicionaron 60  $\mu$ L del paquete de eritrocitos y se incubó en agitación a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente se realizaron 3 lavados, se resuspendió en 10 mL de PBS (1X) y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos. El volumen final se resuspendió en 5 mL de PBS (1X).

#### **4.4.5. Preparación de las placas y carga del antisuero (Asu)**

En placas con fondo en “U” se depositaron 25  $\mu$ L de PBS (1X) en cada uno de los pozos (1-12 y A-H).

En la primera fila de la placa (A) se depositaron 25  $\mu$ L de Asu en cada pozo (1-12) y con la pipeta multicanal se transfirieron de la fila A a la B, previo mezclado de la dilución (PBS-Asu) por pipeteo suave. Se repitió el procedimiento y se transfirieron de la B a la C y así sucesivamente hasta la fila H desechando los últimos 25  $\mu$ L, con lo que se obtuvieron diluciones dobles seriadas: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256

#### **4.4.6. Desarrollo de la prueba**

Ya que la placa estuvo cargada con los Asu en cada uno de los pozos se depositaron 25  $\mu$ L del paquete de eritrocitos sensibilizados. Las lecturas se realizaron a los 30 minutos, 1 hora y a las 2 horas, observando reacción positiva en el fondo del pozo como una aglutinación en forma de roseta y reacción negativa en forma de botones rojos sin aglutinación.

Se utilizó una cepa de referencia serotipo A1 donada por el Dr. GH Frank y el Dr. B. Briggs, NADC, USDA.

## 4.5. Análisis de la información

### 4.5.1. Tasa de Prevalencia

Para calcular la prevalencia de *M. haemolytica* en la población caprina del CEIEPAA se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de prevalencia} = \frac{\text{Total de aislamientos de } \textit{Mannheimia sp}}{\text{Total de la población caprina en el CEIEPAA}} \times 100$$

### 4.5.2. Análisis estadístico

Se determinó si existía diferencia significativa en las frecuencias de aislamiento de *M. haemolytica* con respecto a la variable edad, mediante la prueba de Chi cuadrada con el programa estadístico SPSS.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Aislamiento de *Mannheimia sp.*

De 250 muestras procesadas, se obtuvieron 54 aislamientos sugerentes a la morfología típica de *M. haemolytica* (21.6%). Los cultivos en medio agar-sangre presentaron características similares, entre las que destacan formación de colonias redondas, grisáceas, mucoides y con presencia de  $\beta$  hemólisis. (Figura 1).

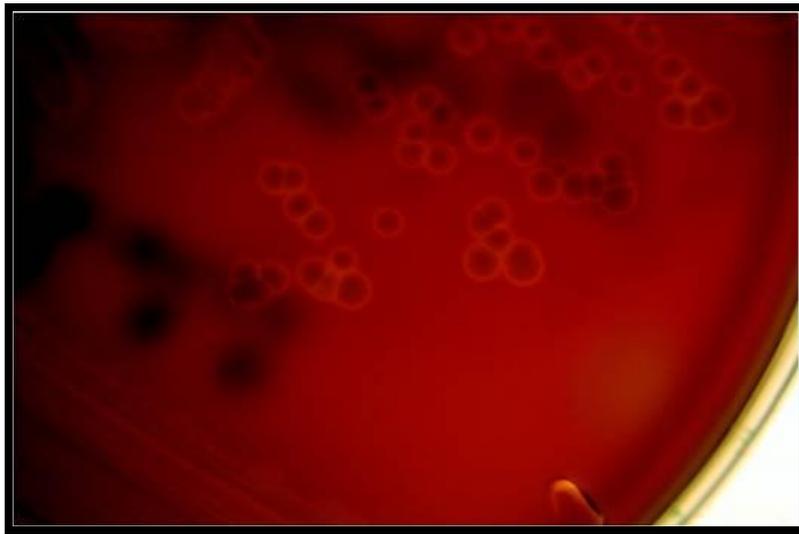


Figura 1. Cepas con características morfológicas de *M. haemolytica* obtenidas de exudado nasal de caprinos del CEIEPAA. Tequisquiapan, Querétaro 2013. Nótese la hemólisis alrededor de las colonias.

## 5.2. Identificación del agente

En la tinción de Gram se observaron bacilos cortos Gramnegativos en el 50% de los aislamientos (27/54). Para la identificación bioquímica de los aislamientos se utilizó la galería de pruebas API 20NE en la que se identificaron 56% (15/27) como cultivos de *M. haemolytica* y 44% (12/27) correspondieron a otras especies bacterianas.

Los 15 aislamientos identificados como *M. haemolytica*, conforme a las especificaciones del sistema API 20NE, obtuvieron porcentajes de identificación mayores al 80%. (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Porcentaje de identificación de aislamientos de *M. haemolytica* mediante galería API 20NE**

Especie	Total de aislamientos	Porcentaje de identificación
	4	94.2
	5	92.9
<i>M. haemolytica</i>	1	88.9
	5	86.5

### 5.3. Tipificación serológica

De los 15 aislamientos de *M. haemolytica* tipificados mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación, 12 (80%) correspondieron al serotipo A7 y 3 (20%) fueron no tipificables (NT) (Figura 2).

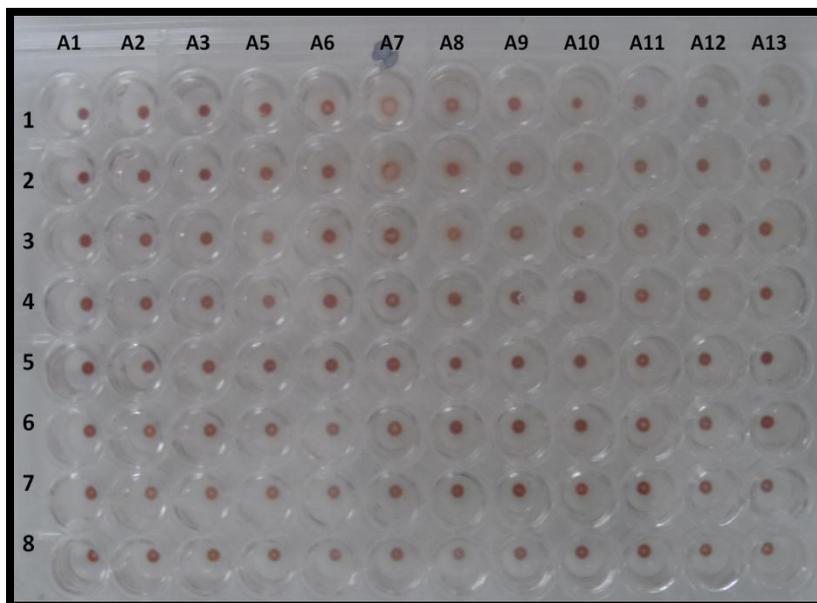


Figura 2. Resultado de tipificación serológica de aislamientos de *M. haemolytica* obtenidos de exudado nasal de caprinos del CEIEPAA, Tequisquiapan, Querétaro, 2013, por medio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación. En la columna que corresponde al antisuero A7 se observa aglutinación en forma de roseta al fondo de los pozos.

#### 5.4. Prevalencia de *M. haemolytica* y sus serotipos en caprinos del CEIEPAA

En la población caprina estudiada, *M. haemolytica* tuvo una prevalencia de 6% (15/250) y por raza las prevalencias fueron para Boer de 30.7% (4/13), Alpino Francés 7.2% (10/138) y Toggenburg 1.8% (1/56) (Figura 3).

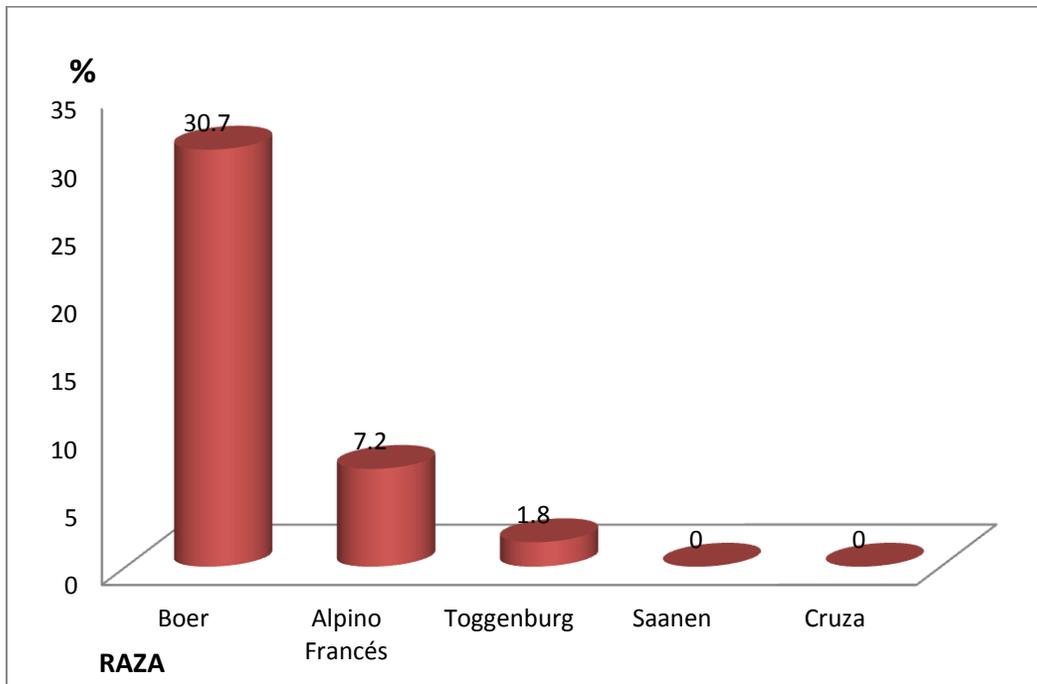


Figura 3. Prevalencias por raza en caprinos del CEIEPAA. Tequisquiapan, Querétaro, 2013.

El serotipo A7 de *M. haemolytica* tuvo una prevalencia de 4.8% (12/250) mientras que los aislamientos NT fue 1.2% (3/250).

Con respecto a la edad, destaca el grupo etario de 6 años, ya que el 60% (9/15) de los aislamientos de *Mannheimia sp.*, el 58% (7/12) de *M. haemolytica* serotipo A7 y el 66% (2/3) de los NT fueron identificados en este grupo etario (Figura 4).

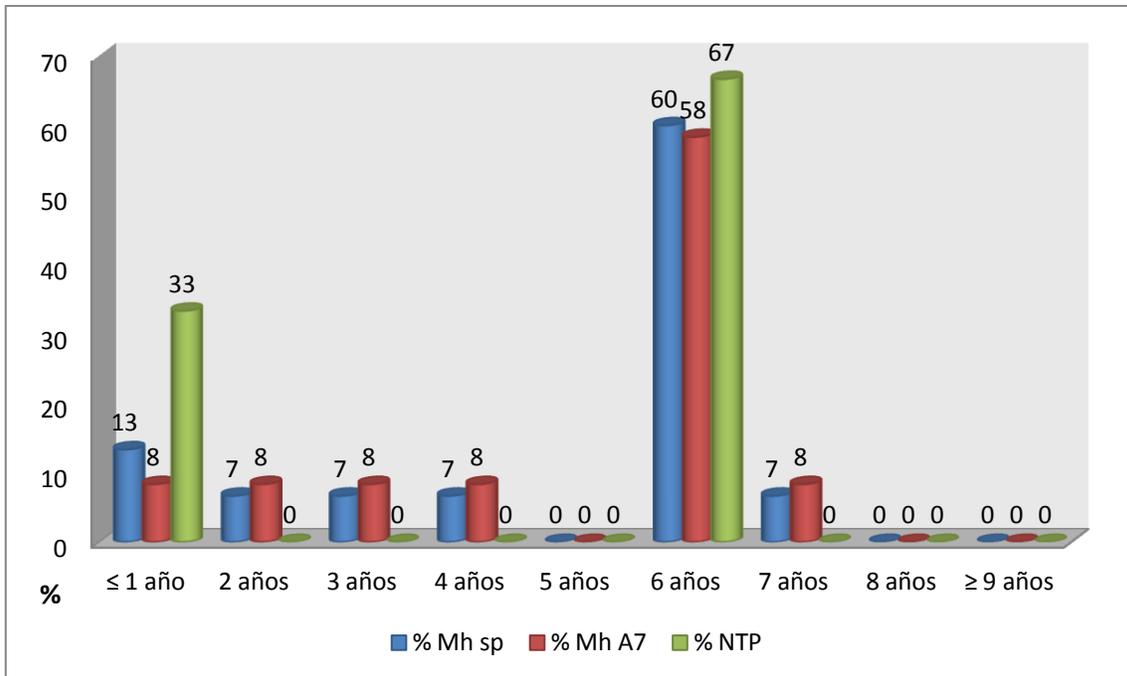


Figura 4. Porcentaje de aislamientos de *Mannheimia sp.*, *M. haemolytica* A7 y aislamientos NT por grupo etario en caprinos del CEIEPAA. Tequisquiapan, Querétaro, 2013.

En cuanto a sexo, el 93% de los aislamientos (14/15) fue en hembras, y solo el 7% restante (1/15) se obtuvo de un macho menor de un año.

### 5.5. Análisis estadístico

Se comprobó que existe diferencia significativa entre la prevalencia de aislamientos de *M. haemolytica* con respecto a los grupos etarios de los caprinos de la población en estudio. ( $p < 0.05$ )

## 6. DISCUSIÓN

La manheimiosis es una de las enfermedades respiratorias con mayor relevancia en términos económicos en las unidades de producción de rumiantes a nivel mundial debido a que puede ocasionar altas tasas de morbilidad, disminución de la ganancia de peso y menor eficiencia en la conversión alimenticia, sobre todo en animales que han sido afectados de forma crónica. Los datos sobre prevalencia de neumonías varían según el país de procedencia, tipos de producción, edad de los animales y época del año en que se realiza el estudio.<sup>11, 12, 19, 25</sup>

Diversos estudios han identificado a *M. haemolytica* en rumiantes domésticos, sobre todo en bovinos y ovinos, pero existen pocas publicaciones en las que se determine la prevalencia y se realice la tipificación de la bacteria en el ganado caprino.<sup>8</sup>

La identificación y serotipificación de *M. haemolytica* es de vital importancia para el control de la enfermedad, ya que permite la elección de medidas de control y vacunación específica contra las serovariedades identificadas, mediante la descripción de los patrones de presentación obtenidos a través de los aislamientos pertenecientes a una misma región.<sup>8</sup>

El uso de kits de identificación para *M. haemolytica* ha sido reportado desde hace muchos años y se ha comprobado que constituyen un método de ampliamente usado en la identificación del género y especie bacteriana.<sup>11, 26</sup>

En los trabajos realizados por Jaramillo *et al.*, en 2007 y 2008, la identificación de *Mannheimia haemolytica* en aislamientos obtenidos del tracto respiratorio alto de bovinos y en el de García en 2010 con la identificación de aislamientos de *Pasteurella multocida* en cerdos se resalta la eficiencia del sistema API para realizar la identificación de esta bacteria.<sup>11, 19, 24</sup>

Estudios realizados en México durante las décadas de los 80 y 90, muestran porcentajes variables de los serotipos de *M. haemolytica* aislados de pulmones neumónicos, identificando al serotipo A1 como el de mayor frecuencia de

aislamiento en bovinos y al serotipo A2 como el más frecuente encontrado en ovinos aunque también se han obtenido aislamientos de A1 y A8; en caprinos se han reportado aislamientos de A1, A2 y A3. <sup>9, 11, 14, 17, 19</sup>

En un estudio, realizado en 616 cepas aisladas de caprinos y bovinos infectados con *M. haemolytica* en Estados Unidos de América, se obtuvo que 60.4% de los aislamientos correspondían a A1, 29.4% a A2 y 10.2% a A6. <sup>19</sup>

Jaramillo *et al.*, en 1985, al analizar 61 cepas de *M. haemolytica* provenientes de pulmones neumónicos de ovinos en México, encontraron que los serotipos más frecuentes fueron el A2 con 25%, el A1 con 15%, el A5 y A11 con 10% cada uno y 20% correspondió a NT. <sup>27</sup>

Trabajando con cincuenta cepas de ovinos en México, Colín, *et al.*, (1987), encontraron que el 28% de las cepas correspondió al serotipo A1, 14% al A5, 8% al A2 y A9, 6% al A8, 2% al A6, A7 y A11 y el 30% a NT. <sup>28</sup>

Argueta *et al.*, (1988), en un muestreo en cavidad nasal de 625 ovinos sanos obtuvo 12% de aislamientos de *M. haemolytica* y los serotipos más comunes fueron A11 (18.7%), A5 (13.5%), A7 (10.52%) y no tipificables (14%). <sup>29</sup>

En el trabajo realizado por Blanco Viera, *et al.*, para identificación de serotipos de *P. multocida* y *M. haemolytica* mediante un muestreo periódico de ovinos y caprinos en los rastros de Ferrería de la Ciudad de México y Tlalnepantla, Estado de México (1989-1990), se obtuvieron aislamientos de pulmones con lesiones inflamatorias y reportaron en ovinos 28 cepas que correspondían 39% al serotipo A8, 32% a A2, 11% a A1, 7% a A6, 4% a A5 y 7% fueron NT. En caprinos consiguieron 2 aislamientos en los que identificaron los serotipos A5 y A8. <sup>25</sup>

Es importante mencionar el estudio realizado por Sanchis, *et al.*, (1989), con 115 cepas de *M. haemolytica*, de las cuales 39 correspondieron a caprinos en las que el 64% fueron serotipo A2. <sup>30</sup>

Como se puede analizar en los estudios antes mencionados solo 3 de ellos fueron realizados en caprinos. Por otra parte las frecuencias reportadas varían entre el

10% y el 64%; los serotipos aislados en esta especie fueron A1, A2, A5, A6 y A8, encontrando mayores porcentajes en los serotipos A1, A2 y A8, lo que contrasta con los resultados de la presente investigación, en la cual los aislamientos de *M. haemolytica* (80%) obtenidos de exudado nasal de caprinos clínicamente sanos fueron caracterizados dentro del serotipo A7.<sup>25, 27-30</sup>

En México se han reportado frecuencias de NT de 9.6 a 18% en pulmones de becerras y de 7 hasta 27% en exudado nasal o en pulmones neumónicos de ovinos. En países como Dinamarca o el Reino Unido se han reportado frecuencias entre el 24 y el 25% en pulmones neumónicos de becerros; en pulmones neumónicos de vacas en Estados Unidos y de vacas, cerdos y ovejas en Dinamarca hasta un 41%; en exudado nasal de becerros se ha reportado 9.3% en la Gran Bretaña y 15.8% en ovinos del medio oeste de los Estados Unidos de América. Las frecuencias más bajas se han reportado en pulmones de ovinos con 3.6% en Etiopía, 7% en Hungría y 8.3% en Turquía.<sup>17, 25, 26, 28, 29, 31-37</sup>

Los resultados en cuanto a aislamientos NT de *M. haemolytica* por la prueba de hemoaglutinación son variables y se reportan en estudios anteriores en valores que van del 7 al 41% y difieren dependiendo de la fuente de aislamiento por lo que han sido descritas como mutantes de *M. haemolytica* donde algunas son deficientes en la producción de antígeno soluble. En el presente trabajo se obtuvo un 20% de aislamientos NT. Algunos estudios mencionan la posibilidad de que cepas clasificadas como NT por la técnica de hemoaglutinación indirecta (HAI), quizá sean cepas serotificables mediante dicha técnica, pero que la imposibilidad de reaccionar a la HAI puede ser consecuencia de la pérdida de antígenos serotipo específicos en la superficie celular.<sup>11, 19, 25</sup>

Diversos estudios señalan que la manheimiosis afecta principalmente a animales jóvenes. En bovinos de Estados Unidos de América se observa una mayor incidencia en becerros de entre 1 a 5 meses de edad recientemente transportados, en becerras lecheras en EUA y Canadá se reportan brotes que llegan a afectar entre el 80% y 90% de los animales y altas tasas de morbilidad en corderos lactantes expuestos a fatiga y enfriamiento.<sup>19, 25</sup>

La población muestreada para esta investigación estaba conformada en su mayoría por animales menores a 1 año de edad, sin embargo, de los individuos dentro de este grupo solo se obtuvo el 13% de los aislamientos, mientras que el 60% de los aislamientos correspondieron a caprinos de 6 años de edad, lo que contrasta con lo reportado por Martínez-Razo (2013), con aislamientos de *M. haemolytica* y *P. multocida* en las principales regiones caprinas de México, en los que se obtuvieron prevalencias mayores en animales jóvenes que en adultos. <sup>8</sup>

## 7. CONCLUSIONES

- Se demostró la presencia de *M. haemolytica* aislada en muestras de exudado nasal de caprinos clínicamente sanos de diversas razas y en diferentes etapas productivas.
- El 65% de los aislamientos de *M. haemolytica* pertenecieron al serotipo A7 con una prevalencia de 5.2%.
- De las cepas identificadas como *M. haemolytica* el 20% fueron no tipificables.
- El 60% de los aislamientos de *Mannheimia sp.*, el 58% de *M. haemolytica* serotipo A7 y el 68% de los NT fueron identificados en caprinos de 6 años de edad
- En México no existen datos similares sobre la identificación y caracterización de *M. haemolytica* en caprinos.
- Se encontró diferencia significativa entre la prevalencia de los aislamientos de *M. haemolytica* con respecto a los grupos etarios de la población en estudios ( $p < 0.05$ ).

## BIBLIOGRAFIA

1. ARÉCHIGA CF, AGUILERA JI, RINCÓN RM, MÉNDEZ DE LARA S, BAÑUELOS VR, MEZA-HERRERA CA. Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* [en línea] 2008, vol. 9 [citado 2010-11-29].
2. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx> Consultada en mayo de 2014.
3. GUERRERO CM. La Caprinocultura en México, una estrategia de desarrollo. *RUDICS - Revista Universitaria de Ciencias Sociales* 2010; 1:8.
4. MERLOS-BRITO. Evaluación de características productivas en cabritos Boer x local, Nubia x local y locales en el trópico seco de Guerrero, México. *Vet Méx* 2008; 39: 323-333.
5. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. Estadísticas <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S> Consultada en mayo de 2014.
6. AACREA (Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola). Caprinos. *Agroalimentos Argentinos II*. [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/procal/estudios/04\\_Caprin o/SectorCaprino\\_Argentina.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/procal/estudios/04_Caprin o/SectorCaprino_Argentina.pdf) Consultada en septiembre de 2013.
7. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Paginas/inicio.aspx> Consultada en mayo de 2014.

8. MARTÍNEZ-RAZO I. Distribución y caracterización molecular de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en las principales regiones caprinas del país (tesis de maestría). D.F. México. UNAM.FMVZ. 2013.
9. OBUKOWHO B, SABRI MY, AKPAVIE SO, ZAMRI-SAAD M. Experimental infection of Peste des Petit Ruminant virus and *Mannheimia haemolytica* A2 in goats: immunolocalisation of *Mannheimia haemolytica* antigens. Vet Res Commun 2010; 34: 569-578.
10. ACKERMANN MR, BROGDEN KA. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Microbes and Infection 2000; 2:1079-1088.
11. JARAMILLO – ARANGO CJ, HERNÁNDEZ – CASTRO R, SUÁREZ – GÜEMES F, MARTÍNEZ MAYA JJ, AGUILAR -ROMERO F, JARAMILLO – MEZA L, TRIGO FJ. Characterisation of *Mannheimia spp.* Strains isolated from bovine nasal exúdate and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. Research in Veterinary Science 2008; 84: 7-13.
12. RICE JA, CARRASCO – MEDINA L, HODGINS DC, SHEWEN PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. Animal Health Research Reviews 2008; 8: 117-128.
13. YENER Z, ILHAN F, ILHAN Z, SAGLAM YS. Inmunohistochemical detection of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* antigens in goats with natural pneumonia. Vet Res Commun; 2009; 33: 305-313.

14. PURDY WC, COOLEY DJ, STRAUS DC. Cross- Protection Estudios with Three Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in the Goat Model. *Current Microbiology* 1998; 36: 207-211.
15. ZAMRI-SAAD M, MERA HR. The Effect of *Pasteurella haemolytica* A2 Infection on Phagocytosis Efficiency of Caprine Broncho – Alveolar Macrophages. *J Vet Med B* 2001; 48: 513-518.
16. FETT T, ZECCHINON L, VANDEN BERGH P, DESMECHT D. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin – induced cytolysis of caprine (*Capra hircus*) leukocytes is mediated by the CD18 subunit of  $\beta$ 2 – integrins. *Microbial Pathogenesis* 2008; 45: 337-342.
17. SISAY T, ZERIHUN A. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* Serotypes from Apparently Healthy Sheep and Abattoir Specimens in the Highlands of Wollo, North East Ethiopia. *Veterinary Research Communications* 2003; 27: 3-14.
18. PURDY CW, STRAUS DC, CHIRASE N, AYERS JR, HOOVER MD. Effects of Aerosolized Dust in Goats on Lung Clearance of *Pasteurella* and *Mannheimia* Species. *Current Microbiology* 2003; 46: 174-179.
19. JARAMILLO-ARANGO CJ, TRIGO FJ, SUÁREZ-GÜEMES F. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet Méx* 2009; 40: 293-314.
20. TEFERA G, SMOLA J. *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella sensu strict* as new genus *Mannheimia*: Changes in taxonomy. *Vet. Med.* 2001; 46: 119-124.

21. ANGEN O, MUTTERS R, CAUGANT D, OLSEN J, BISGAARD M. Taxonomic relationship of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999; 67-86.
22. MÉNDEZ LM. Detección de leucotoxina en aislamientos de *Mannheimia haemolytica* provenientes de exudados nasales de bovinos productores de leche (tesis de licenciatura). D.F. México. UNAM.FMVZ. 2010.
23. SUÁSTEGUI UZ. Identificación de *Mannheimia* spp., mediante la secuenciación de los genes de la subunidad 16S ADNr y rpoB (tesis de licenciatura). D.F. México. UNAM.FMVZ. 2010.
24. GARCÍA BN. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino (tesis de doctorado). Madrid, España. Universidad complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. 2010.
25. BLANCO-VIERA, F.J., TRIGO, T.F., JARAMILLO MEZA, L., AGUILAR ROMERO, F., TAPIA PÉREZ, G., SUÁREZ GÜEMES, F. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias de ovinos y caprinos. Vet. Mex. 1993; 24:107-112.
26. ANGEN O, AHRENS P, BISGAARD M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. Vet Microb. 2002; 84: 103-114.

27. JARAMILLO L, AGUILAR F, MERINO M, TRIGO FJ, MARTÍNEZ HA. Serotipos de *Pasteurella haemolytica* involucrados en pasteurelisis pulmonar ovina. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1985. SARH-UNAM. 1985; 72.
28. COLIN FR, TRIGO FJ, JARAMILLO ML, AGUILAR RF, MERINO MM. Serotipos de *Pasteurella haemolytica* aislada de pulmones neumónicos de ovinos en México. Rev. Latinoam. Microbiol. 1987; 29: 231-234.
29. ARGUETA GJ, TRIGO FJ, MERCADO PM. Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Vet. Mex. 1988; 19: 93-97.
30. SANCHIS R, ABADIE G, POLVERONI G. Typing *Pasteurella haemolytica*. Study of 115 strains isolated from sheep and goats. Recl. Med. Vet. 1989; 165: 129-133.
31. PIJOAN P, AGUILAR RF, MORALES AF. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. Vet. Méx. 1999; 30: 149-155.
32. JARAMILLO ML, AGUILAR RF, TRIGO TFJ. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos en becerros en México. Vet. Méx. 1987; 18: 185-188.
33. AL-GHAMDI GM, AMES TR, BAKER JC, WALKER R, CHASE CC, FRANK GH, MAHESWARAN SK. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. J Vet Diagn Invest. 2000; 12: 576-578.

34. WRAY BC, THOMPSON DA. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. Br Vet. 1971; 127: lxvi-lxvii.
35. FRANK GH. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the Midwestern United States. Am J Vet Res. 1982; 43: 2035-2037.
36. FODOR L, VARGA J. Characterisation of a new serotype of *P. haemolytica* isolated in Hungary. Res Vet Sci. 1988; 44: 399.
37. KIRKAN S, KAYA O. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* strains pneumonic lungs of sheep in the Aydin Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29: 491-494.