

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente sanos en la Comarca Lagunera.

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

POR

Dinora Flores Gámez.

ASESOR

M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González

Torreón, Coahuila

Noviembre de 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente sanos en la Comarca Lagunera.

TESIS

APROBADA POR EL COMITÉ DE TESIS

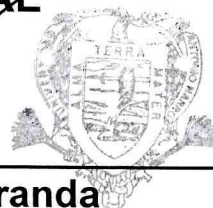
PRESIDENTE DEL JURADO



M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**


M.C. Ernesto Martínez Aranda



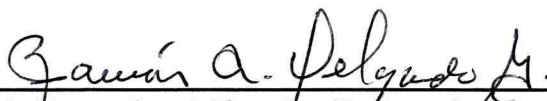
Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

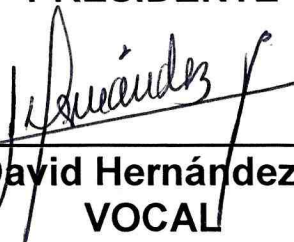
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia*
haemolytica y *Pasteurella multocida* en bovinos
Holstein clínicamente sanos en la Comarca Lagunera.



M. C. V. Ramón Alfredo Delgado González
PRESIDENTE



Ph D. Juan David Hernández Bustamante.
VOCAL



M. V. Z. Rodrigo Isidro Simon Alonso.
VOCAL



M. C. Ernesto Martínez Aranda
VOCAL SUPLENTE

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS. por darme la vida, la oportunidad de tener una familia y guiarme en este camino.

A MIS PADRES: JOSE MANUEL FLORES MUÑOZ Y ROSALINDA GAMEZ ORTIZ. Por el gran apoyo brindado en las buenas y en las malas.

A MIS HERMANOS: SUSANA O., JOSE MANUEL, ADA NALLELI. Por estar siempre conmigo, por ser fuente importante de motivación.

A ROBERTO MIRELES GONZALEZ. Por existir y estar conmigo.

A MI ALMA TERRA MATER. Por darme la oportunidad de formar parte de ella y por darme las herramientas necesarias para salir adelante..

A MIS AMIGOS, COMPAÑEROS Y EQUIPO DE TRABAJO: DOC. JUAN DAVID HERNANDEZ B., JORGE F. GARCIA, OLIVIA GARCIA, INES LEON, JESUS SILVA, MARIO ITURBE, LUCIO FLORES, GUADALUPE MACHADO, ELSA URQUISA. Gracias por ayudarme a realizar este proyecto de tesis.

AL DOC. RAMON A. DELGADO GONZALEZ. Gracias por ser amigo, maestro y colaborador. Por permitirme formar parte de su equipo de tesis.

AGRADECIMIENTOS EL APOYO DE CONACYT POR EL FINANCIAMIENTO, LA CLAVE DEL PROYECTO ES G-38590-B DIRIGIDO POR EL DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA, DOC. CARLOS JARAMILLO, Y AL DOC. FRANCISCO AGUILAR ROMERO. Por su incondicional apoyo y la oportunidad brindada.

DEDICATORIA.

Con mucho cariño dedico este trabajo de tesis a mis padres, hermanos, a Roberto Mireles González y a esa pequeña luz que al final me motivo para poder terminar con este proyecto; a ti Mariano.

RESUMEN.

Considerando que *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* forman parte de la flora bacteriana del tracto respiratorio en bovinos clínicamente sanos, los objetivos del presente estudio fueron: identificar aislamientos de dichos microorganismos y determinar la frecuencia de los mismos en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera, en una muestra no aleatoria de 24 establos. El presente estudio se realizó en la temporada invierno-primavera (enero-abril) a partir de hisopos nasales en 1165 bovinos Holstein clínicamente sanos. Las muestras fueron analizadas en la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en la Unidad Laguna. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 39 aislamientos para *Mannheimia haemolytica* (3.34%) y 33 aislamientos para *Pasteurella multocida* (2.83%); obteniendo un total de 72 muestras positivas (6.18%). Concluyendo que la frecuencia de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* fue significativamente mayor en bovinos menores de un año que en bovinos mayores de un año.

INDICE DE CONTENIDO.

	Página
Resumen	i
INTRODUCCIÓN	1
REVISION DE LITERATURA	2
I. ANTECEDENTES	2
II. ETIOLOGÍA	2
2.1. Taxonomía de <i>Pasteurella</i> y <i>Mannheimia</i> .	3
2.2. <i>Mannheimia haemolytica</i> .	3
2.3. <i>Pasteurella multocida</i> .	5
III. PATOGENIA.	7
IV. SIGNOS Y LESIONES.	9
4.1. Signos.	9
4.2. Lesiones macroscópicas.	10
4.3. Lesiones microscópicas.	10
V. DIAGNÓSTICO.	10
VI. CONTROL Y TRATAMIENTO	12
6.1. Antibióticos.	13
6.2. Anti-Inflamatorios.	14
6.3. Antioxidantes y otros agentes terapéuticos.	15
6.4. Vacunación.	15
VII. EPIDEMIOLOGÍA.	16
JUSTIFICACION.	19
OBJETIVOS.	19
1. Objetivo General.	19
2. Objetivos específicos.	19
MATERIAL Y METODOS.	19
Marco de Referencia.	19
Procedimiento.	20
Obtención de muestras.	21

Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i>.	21
técnicas de siembras en medios de cultivo utilizadas para la identificación de posibles colonias de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i>.	22
RESULTADOS.	24
DISCUSIÓN.	27
CONCLUSIONES.	30
LITERATURA CITADA.	31
ANEXO.	35

INDICE DE CUADROS.

CUADRO	Pag.
1. Pruebas bioquímicas de identificación que permite la diferenciación entre los géneros <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> .	11
2. Relación de hatos lecheros muestreados en la Comarca Lagunera para el aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> .	25
3. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en Bovinos Holstein clínicamente sanos de la Comarca Lagunera.	25
4. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en bovinos mayores de 1 año.	26
5. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> en bovinos menores de 1 año.	26

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA	Pág.
1. Siembra para aislamiento en cultivo puro.	22
2. Picadura con asa recta.	22
3. Siembra por picadura en el fondo del tubo y en estría sobre la superficie del medio.	23
4. Siembra en estrías cerrada.	23

INTRODUCCIÓN.

El complejo respiratorio comúnmente observado en los bovinos se caracteriza por manifestaciones clínicas producto de una secuencial y compleja interacción multifactorial que terminan en procesos bronconeumónicos supurativos o fibrinosos. Los factores que interactúan comprenden agentes infecciosos como virus, bacterias, además de sinergismo virus - bacteria, factores ambientales estresantes y la susceptibilidad del hospedador (Cardoso. y col., 2002; Clavijo y col. 2002; Hodgson y col. 2005).

Estos virus causan efecto citopático directo en el aparato respiratorio, y además, reduce la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar, lo cual facilita la colonización pulmonar por *Pasteurella* spp (Zanabria y col., 2000). Siendo los virus más comunes en esta asociación el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, el virus de la parainfluenza tipo III y el virus sincicial respiratorio bovino. Por otra parte, entre las bacterias involucradas se encuentran la *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus sommnus* y *Mycoplasma* spp (Morales y col. 1993; Hodgson, 2005).

La mayor cantidad de investigaciones sobre neumonías en México se han realizado en ovinos. Siendo necesario realizar investigaciones en bovinos para de esta manera contribuir en el conocimiento de las enfermedades respiratorias en este País. En la Comarca Lagunera no se han realizado estudios de este tipo y por lo tanto la finalidad de la presente investigación es buscar la frecuencia de aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* a partir de hisopos nasales de bovinos Holstein clínicamente sanos.

REVISION DE LITERATURA.

I. ANTECEDENTES.

El género *Pasteurella*, es comensal habitual del tracto respiratorio superior de los rumiantes domésticos y silvestres, constituyen las bacterias aisladas en los procesos neumónicos de los animales domésticos, entre los cuales el problema de mayor importancia es la pasteurelosis pulmonar bovina, también llamada fiebre de embarque, enfermedad respiratoria generalmente fatal que se caracteriza por una pleuroneumonía fibrinosa grave, y que afecta principalmente animales menores de un año (becerros de 1 a 5 meses de edad), recientemente transportados, con una mayor incidencia en animales nacidos durante el otoño e invierno (Trigo, 1987).

II. ETIOLOGÍA.

El agente causal de la enfermedad de Fiebre de embarque se llamó por primera vez *bacteria bipolar multocidum* por Theodore Kitt en 1885. En 1896, Flugge lo renombró *Bacillus bovisepitica*, que mas tarde se subdividió en grupos separados que causan neumonía fibrinosa bovina (*Pasteurella bovisepitica*) o septicemia hemorrágica (ahora conocido como *Pasteurella multocida*) (Highlander, 2001).

En 1932, Newson y Cross propusieron el nombre de *Pasteurella haemolytica* para la bacteria que causa pulmonía en terneros. *Pasteurella haemolytica* dividido en dos biotipos, A y T, basado en la habilidad para fermentar arabinosa y trehalosa, respectivamente (Jaramillo y col., 1987, Kodjo y col., 1999). En 1962, el serotipo capsular se estableció, y alcanzo 17 serogrupos. Los serogrupos 1,2,5,6,7,8,9,11,12,13,14,16 y 17 corresponden al

biotipo A y los cuales están asociados a producir neumonía, mientras al género *Pasteurella* se le asignó una especie nueva, *P. trehalosi*, (anteriormente *P. haemolytica* tipo T) los tipos capsulares T3, T4, T10 y T15 se encuentran mundialmente en ovejas y cabras donde causan septicemia severa en animales jóvenes (Argueta G. y col. 1988; Glynn; Kehrenberg y col., 2001).

Pasteurella haemolytica se excluyó del género *Pasteurella*, basado en la hibridación ADN y comparaciones de nucleótidos de 16S ribosomal ARN reclasificándose con el nombre de *Mannheimia haemolytica* (Highlander, 2001).

2.1. Taxonomía de *Pasteurella* y *Mannheimia*.

La familia *Pasteurellaceae* comprende cinco géneros que han sido reclasificadas en *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Haemophilus* y *Lonepinella* (Kehrenberg, 2001; Quinn y col., 2003).

Según la clasificación propuesta por Angen y colaboradores, el género *Mannheimia* comprende cinco especies: *M. haemolytica*, *M. granulomatis*, *M. glucosida*, *M. ruminalis* y *M. varigena* (Narayanan, 2002).

2.2. *Mannheimia haemolytica*.

Mannheimia haemolytica es un cocobacilo pequeño (a veces algo pleomórficos) bipolar, mide 0.2 x 1-2 mm, encapsulado, gram negativo, inmóvil, hemolítico, anaerobio, capaz de crecer en agar MacConkey, oxidasa y catalasa positivos pero indol negativo, sus colonias son grisáceas y circulares (Angen y col., 1999; Narayanan, 2002; Quinn y col., 2003).

Está constituida de numerosas proteínas, polisacáridos y lípidos potencialmente antigénicos. Los antígenos incluyen una exotoxina (leucotoxina) que es producida durante la fase de crecimiento logarítmico, una proteasa, una

neuraminidasa, una cápsula gruesa de lipopolisacáridos o endotoxinas (LPS), proteínas de la membrana externa y fimbrias. Adicionalmente las bacterias gram negativas tienen una envoltura interna compuesta de lipoproteínas, proteínas y peptidoglicanos son los factores de virulencia primarios contribuyendo a la patogénesis de lesiones pulmonares en neumonías bovinas (Trigo, 1991; Hsuan y col. 1998; Starr, 2004; Seleim, 2005).

Se caracteriza por densa infiltración de neutrofilos, esta infiltración es asociada con extensa necrosis del parénquima que es en parte, debido a productos bacterianos de leucotoxinas, endotoxinas y neutrofilos (Ackermann y col., 1999).

Es la bacteria que con mayor frecuencia se encuentra a través de aislamientos ya que habita normalmente en las criptas de las tonsilas del bovino sano y, además, es una importante oportunista del tracto respiratorio debido a que usualmente coloniza la parte alta del mismo (Argueta y col., 1988; De la Rosa, 2004).

Mannheimia granulomatis es un cocobacilo, gram negativo, no móvil y las colonias son lisas, de 1 a 2 mm de diámetro en un periodo de incubación de 24 horas. Se ha aislado en casos de paniculitis y bronconeumonías en bovinos, también se ha encontrado en casos de conjuntivitis, bronconeumonía de venados, con granulomas en piel, así como otras condiciones de enfermedad en el ganado. *Mannheimia glucosida* contiene el serotipo 11 de *Mannheimia haemolytica* aislada de bovinos y el resto son aislamientos de ovinos. Fermenta D-sorbitol, D-xilosa, maltosa y dextrosa. Normalmente no están asociadas a enfermedades y probablemente representa parte de la microflora residente de

tracto respiratorio alto. *Mannheimia ruminalis* para las características bioquímicas se hace descripción de género que consiste en dos variables; la variable uno consiste en que no fermenta la maltosa y la dextrosa; y la segunda variable es que reacciona con la fermentación de D-sorbitol y D-xilosa. Es una bacteria no hemolítica que ha sido aislada de rumen de bovinos y ovinos y no está asociada a la presencia de enfermedad. *Mannheimia varigena*, cocobacilo gram negativo; ha sido aislada de neumonías y septicemias tanto en bovinos y ovinos y porcinos (Angen y col., 1999; Aguilar y col., 2003; Trigo; 2005).

2.3. *Pasteurella multocida*.

La *Pasteurella multocida* es un cocobacilo pequeño, usualmente mide de 2-3 mm de diámetro, bipolar, anaerobio, gram negativos, no móvil, no esporulado ni productor de hemólisis, no tiene habilidad de crecimiento en agar MacConkey, pero es oxidasa, catalasa e indol positivos y producen colonias mucoides (Timoney y col. 1988; Aguilar, y col., 2003).

Es un bacilo que presenta antígenos capsulares y somáticos, por lo cual los métodos actuales de serotipificación son cinco serogrupos capsulares (A, B, D, E, F) y 16 serotipos (Townsend y col. 2001; Fagliari, 2003).

Pasteurella multocida es aislada con menor frecuencia que *M. haemolytica*, participa de manera importante en el complejo respiratorio de ovinos y bovinos, es frecuente encontrarle en heridas humanas producidas por mordeduras de perros y gatos. La enfermedad resultante incluye meningitis, abscesos, septicemia, e infección de la herida que son lentas para sanar con una descarga sucia y acuosa. Produce una bronconeumonía supurativa que se vuelve crónica, pero al resolverse deja manifestaciones de cicatrización y

abscesos, con frecuencia afecta al 50% del pulmón al momento de la muerte (Tomoney y col., 1988; Fagliari, 2003).

El serotipo A1 es el más comúnmente aislado de casos clínicos de pasteurelisis neumónica bovina. En ovinos el serotipo más importante a nivel de mucosa respiratoria es el A2. Los estudios realizados en México han demostrado la mayor importancia de los serotipos A1, A2, A5 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos (Trigo, 2005).

Mientras que el tipo B es responsable de la septicemia hemorrágica del ganado (rumiantes, búfalos y recientemente en cerdos) en Asia; mientras que el tipo E se presenta en África (García y col., 1988; Quinn y col., 2003).

El tipo D es de gran importancia económica en crianza de cerdos, ya que se caracteriza por atrofia nasal y en casos severos puede llevar a distorsión facial; en ocasiones se presenta en bovinos con problemas neumónicos, no se ha delimitado su región geográfica y no tiene relación con la septicemia hemorrágica (García y col., 1988; Davies y col., 2003).

En otras especies animales, *P. multocida* puede actuar también como patógeno primario en cólera aviar, una enfermedad común y extensamente distribuida en granjas aviares, siendo de mucha importancia económica (Blackall y col., 1998).

En conejos es una causa significativa de sinusitis. Frecuentemente el síndrome clínico que más ocurre es infección del tracto respiratorio superior. Aunque las preparaciones nasales frecuentemente son realizadas para identificar infecciones respiratorias, son de limitado valor ya que pueden resultar negativos. Además de que *P. multocida* infecta otros órganos, orejas,

pulmones, senos paranasales, órganos reproductores, riñones, hígado, nódulos linfáticos y huesos (Peterson y col., 1997).

III. PATOGENIA.

Cuando ocurre la infección viral en el pulmón, el virus infecta principalmente a las células epiteliales de los bronquios, bronquiólos y alvéolos, alcanzando títulos de proliferación viral entre los tres y cinco días postinfección. De no ocurrir una infección bacteriana secundaria, el pulmón se encuentra totalmente normal a las cuatro semanas de iniciada la infección (Zanabria y col., 2000).

Durante la fase aguda de la infección viral en el pulmón, los mecanismos bactericidas se encuentran esencialmente normales. Sin embargo casi una semana después de la infección viral, la actividad antibacteriana pulmonar se suprime marcadamente, de tal forma que las bacterias pueden proliferar. El macrófago alveolar desempeña la función principal en la defensa del pulmón contra infecciones bacterianas. Por tanto, se determinó que la proliferación bacteriana en el pulmón se debe a anomalías en la ingestión e inactivación intracelular de bacterias por parte del macrófago alveolar, esto se explica debido a que los macrófagos alveolares contienen antígeno viral, por lo cual son destruidos por el sistema inmune, así se eliminan a las células que contienen virus, aunque se deja al pulmón temporalmente sin suficientes macrófagos funcionales (Trigo, 1991).

Tras los factores predisponentes, se desencadena la entrada aerógena de *P. multocida* o *M. haemolytica*, y hay adhesinas que favorecen la adhesión al epitelio pulmonar. La cápsula favorece la resistencia a la fagocitosis. La

neuraminidasa altera los mecanismos de depuración mucociliar y en conjunto permite una colonización pulmonar (Fagliari, 2003).

Las leucotoxinas y endotoxinas también actúan. Esta leucotoxina es una proteína sintetizada y excretada por *M. haemolytica* durante su fase de crecimiento logarítmico. Es un miembro de la familia de las toxinas RTX (*repeats in toxin*) (Maheswaran y col. 1993). Las toxinas RTX lisan células blanco mediante la formación transmembranal de poros. Muchas toxinas RTX, incluyendo la LKT de *M. haemolytica*, son también potentes estimuladores de leucocitos cuando están presentes en bajas concentraciones, induciendo la expresión de citocinas proinflamatorias, que favorecen la severidad de las lesiones y el desarrollo de la neumonía fibrinopurulenta aguda del ganado (Trigo, y col., 2005)

Las leucotoxinas son glicoproteínas que afectan específicamente a los neutrofilos, monocitos, macrófagos y linfocitos de rumiantes, tienen una acción citotóxica sobre los macrófagos alveolares, liberando además, proteasas, provocando una inmunodepresión y destrucción de epitelios (Maheswaran y col. 1993; Davies y col., 2001).

Las endotoxinas tienen un efecto más local, capaces de cruzar la pared alveolar, aumenta la adherencia de neutrofilos, alteración de la membrana celular de células del endotelio, y efectos generales como fiebre, hipoxia, hipotensión y mayor densidad de surfactante pulmonar, provocando lesión en las vías respiratorias altas, en las vías respiratorias bajas y en pulmón que da a una neumonía (Trigo, 1991; Glynn).

IV. SIGNOS Y LESIONES.

La presentación y severidad de las lesiones neumónicas en becerras depende de una serie de interacciones complejas entre diversos agentes infecciosos y varios factores de manejo que provocan estrés, tales como el nivel de inmunoglobulinas del calostro, el tipo de alojamiento donde se mantienen las becerras, o la presencia de gases, producto de orina o heces en dicho alojamiento (Pijoan, y col., 1999).

Aunque diversos virus tales como el virus de la parainfluenza tipo III, el virus sincitial respiratorio bovino o el virus de la rinitis infecciosa bovina, así como micoplasmas, se distinguen como agentes predisponentes a la presentación de las neumonías en becerras, ya que producen las lesiones pulmonares iniciales. Los signos clínicos y la extensión de lesiones pulmonares son mucho mas severos cuando se involucra *Mannheimia haemolytica* y *Haemophilus sommnus*, que la producida por *Pasteurella multocida* por si sola (Maheswaran, y col., 1993).

4.1. Signos.

Los animales afectados presentan disnea, depresión, tos y descarga nasal (Highlander, 2001). Algunos animales muestran signos asociados o descritos como la fiebre de embarque con severa depresión, cabeza y orejas caídas, resistencia al movimiento y secreción nasal mucopurulenta. Estos últimos signos tienden a asociarse a liberación severa de endotoxinas de bacterias gram negativas tales como *Pasteurella* spp (Zanabria y col., 2000).

4.2. Lesiones macroscópicas.

En la necropsia se observan lesiones catarrales y mucopurulentas de nasofaringe y tráquea, inflamación aguda y fibrinosa de pulmón, principalmente de distribución craneoventral, de pleura y pericardio y neumonía hemorrágica (Trigo, 1991; Pijoan y col., 1999; Starr, 2004).

Las lesiones ocasionadas por microorganismos del género *Pasteurella* spp. se encuentran como neumonías de tipo lobular, así como engrosamiento de septos interlobulillares, con marcada congestión y las endotoxinas producen alteración de la membrana celular de células del endotelio, provocando edema del parénquima pulmonar, hiperemia, trombosis vascular, atelectasia y hemorragia pulmonar, se presentan comúnmente depósitos de fibrina, que forman adherencias entre los diferentes órganos de la cavidad torácica (Lafleur y col., 1998; Breider y col., 1991; Maheswaran y col., 1993; Cusack y col., 2003).

4.3. Lesiones microscópicas.

Sin embargo, las lesiones microscópicas, no muestran alteraciones histológicas características de cada agente infeccioso en particular. Los agentes virales tienden a producir reacciones predominantemente intersticiales comprometiendo bronquios y bronquiólos. Mientras que la mayoría de las bacterias promueven formaciones fibrinosas e infiltración granulocítica (Yates y col., 1982).

V. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de síndromes neumónicos en bovinos es complejo. Si bien es cierto que la dificultad respiratoria es una evidencia clínica del proceso

neumónico, estas alteraciones clínicas aisladamente no ayudan a determinar los posibles agentes neumopatógenos. Consecuentemente, el diagnóstico etiopatogénico de los problemas respiratorios debe integrar, además del clínico, análisis serológico, microbiológico y cuando sean posible exámenes posmortem que incluyan las observaciones macroscópica, microscópicas e identificación de agentes causales (Zanabria y col., 2000).

En el laboratorio el aislamiento exacto de *Pasteurella multocida* depende mediante el aislamiento e identificación de colonias bacterianas sospechosas mediante microscopia y pruebas bioquímicas. Muestras tomadas inmediatamente de animales que se sospecha han muerto de pasteurelisis (Kirsty y col., 1998). La mayor frecuencia de aislamiento por hisopados ofrece una buena alternativa para los estudios de pasteurelisis en casos clínicos asociados con neumonías (Aguilar y col., 2003).

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas de identificación que permite la diferenciación entre los géneros *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

Pruebas	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
Oxidasa.	Positiva	Positiva
TSI	Reacción de acidez	Reacción de acidez
Motilidad.	Negativo	Negativo
Glucosa.	Positiva	Positiva
Hemólisis	Positivo	Negativo
Crecimiento en Mac ConKey	Positivo (a)	Negativo
Reducción de Nitratos	Positivo.	Positivo.
Indol.	Negativo.	Positivo.
Urea.	Negativo.	Negativo.

(a) Solo algunas cepas la presenta y es limitado (Aguilar y col., 2003;

Chapter. 2005).

En recientes años, métodos de genotipificación y de identificación bacteriana han demostrado beneficios superando algunas limitaciones de procedimientos tradicionales de fenotipificación de nucleótidos. PCR ha sido considerablemente útil, con el uso de secuencias diseñadas a facilitar la identificación de especie, genero (Kirsty y col., 1998).

El diagnóstico antimicrobiano comúnmente utilizados para la comprobación de susceptibilidad de antimicrobiano bacteriana. El agar disco difusión es el método que se ha usado para probar patógenos bacterianos rápido y común, se ha reconocido para trabajar bien con *P. multocida* y *M. haemolytica*. Pueden obtenerse resultados fiables. La selección de los agentes antimicrobianos más apropiados para probar es mejor una decisión hecha por cada laboratorio de acuerdo con las necesidades de veterinarios y las drogas disponibles para el uso veterinario en el país (Chapter. 2005).

VI. CONTROL Y TRATAMIENTO.

Aunque el Complejo Respiratorio Bovino (CRB) puede iniciarse por una variedad de agentes patógenos, debido a la importancia que reviste *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, y *Haemophilus somnus*, como los microorganismos que producen las principales lesiones pulmonares, la terapia antibiótica debe concentrarse en combatir estos tres agentes. Sin embargo un gran problema que presentan los veterinarios; es tipo de antibióticos y dosis en la que se pueden utilizar y será efectivo ya que desde hace mas de 20 años se informó del aislamiento de cepas de *Pasteurella* spp. que mostraban resistencia a uno o más antibióticos llegando en la actualidad al grado que la resistencia

mostrada por estos agentes a distintos antimicrobianos ha alcanzado niveles preocupantes (Pijoan y col., 2000; Clavijo, y col., 2002).

6.1. Antibióticos.

Los antibióticos registrados para el uso en el ganado de Australia y normalmente tratados con CRB incluyen oxitetraciclinas, sulfas con trimetropim, tilmicosina y ceftiofur. Florfenicol es comúnmente utilizado en América del Norte; mientras que la Enrofloxacin y el ceftiofur es utilizado eficazmente en EE.UU. y Europa desde 1988; Posteriormente la tilmicosina se introdujo en Canadá y EE. UU. En 1991. Para su uso estudios comparativos ha mostrado variación en la eficacia de antimicrobianos en el tratamiento de CRB. La eficacia de antimicrobianos es afectado por la sensibilidad de los organismos designados y el reconocimiento temprano (Watts y col., 1994; Cusack, y col., 2003).

Previamente varios autores han informado, del aislamiento de algunas cepas de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, que han mostrado resistencia a uno o más antibióticos, de esta forma se ha indicado una alta proporción (superior al 80%) de *Pasteurella* spp. resistentes a estreptomicina, lincomicina, penicilina, ampicilina y tetraciclina; por el contrario se ha informado de una alta incidencia de cepas de *Pasteurella* spp. sensibles al sulfametoxazol-trimetropim. De igual forma existe en la literatura internacional multitud de referencias sobre la eficacia de diversos antibióticos en el tratamiento de las neumonías en bovinos, eficacia demostrada por la oxitetraciclina, trimetropim-sulfadoxina, ampicilina, penicilina o tilmicocina (Clavijo y col., 2002).

Con base en estudios realizados en México, Salas y col., mostraron una alta proporción de cepas de *Pasteurella* spp. aisladas de bovinos sacrificados en rastros sensibles a la ampicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina y trimetropim-sulfametoxasol (Pijoan y col., 2000).

Recientemente Singer y col., demostraron la importancia de determinar regionalmente los patrones de resistencia de *Pasteurella* spp., a diversos antibióticos ya que observaron variaciones muy significativas en la efectividad de la ampicilina y tetraciclina en bovinos de diferentes regiones (Kehrenberg y col., 2001).

Los agentes de antimicrobianos usados para el tratamiento de CRB deben ser seleccionados por el veterinario en base a eficacia percibida, costo, conveniencia, disponibilidad, toxicidad, y perfil de residuos (Watts, y col., 1994).

6.2. Anti-inflamatorios.

Mucha de la presentación clínica del CRB es debido al tracto respiratorio inflamado. La severidad de la enfermedad puede ser reducida por consiguiente por la administración de drogas anti-inflamatorias el uso de corticosteroides en el tratamiento esta contraindicada debido a sus efectos de inmunosupresión. La administración de meglumine de Flunixin a los terneros con pulmonía por PI3 produjo una mejora en las señales clínicas y una reducción en la consolidación del pulmón. Además el meglumine de Flunixin también tiene actividad anti-endotoxica que puede ser ventajoso en casos de CRB donde *M. haemolytica* o *P. multocida* se encuentran presentes (Cusack y col., 2003).

6.3. Antioxidantes y otros agentes terapéuticos.

Ningún informe se encontró en el uso de antioxidantes en el tratamiento de CRB. Actualmente se han investigado otros agentes como broncodilatadores, antihistamínicos, mucolíticos, incluyendo inmunodilatadores y diuréticos (Cusack y col., 2003).

6.4. Vacunación.

Los problemas con la vacunación aumentan debido a que hay más de un serotipo de cierta especie, y que en algunas vacunas pueda faltar el serotipo. Por consiguiente, la información en los serotipos capsulares también debe tomarse en consideración para desarrollar vacunas eficaces. En el caso de *Mannheimia haemolytica*, el serotipo A1 es el normalmente aislado de los pulmones neumónicos del ganado y generalmente los únicos serotipos introducidos en las vacunas comerciales. Actualmente, mencionan el aislamiento de serotipos A6 los cuales se utilizan en la Gran Bretaña, en Francia y en América del Norte. Por consiguiente, la insuficiencia entre la composición de vacunas en términos de especies bacterianas y de serotipos capsulares, además del área epidemiológica, puede ser la causa principal de fracaso para proteger a los animales (Kehrenberg y col., 2001).

En México, Morales y col., 1993; desarrollaron una evaluación experimental de un inmunogeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos ya que el uso de las bacterinas se van desechando día con día pues no han tenido efecto en la prevención del problema. Evidencias clínicas muestran que animales bacterinizados han desarrollado una neumonía mas severa al desafío,

comparados con los animales no bacterinizados. Los inmunógenos a base de bacterias vivas de cultivos de 6 horas han dado resultados más satisfactorios.

VII. EPIDEMIOLOGÍA.

La pasteurelosis neumónica bovina fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1915 y en el Reino Unido en 1925 (Gibbs, y col. 1984). La primera información del problema apareció en 1921, donde se aisló el germen de rumiantes, y en 1932 se propuso el nombre de *Pasteurella haemolytica* (Biberstein, 1978; Merchant, 1994)

La morbilidad que ocasiona la pasteurelosis neumónica bovina en el ganado es un problema desafiante y persistente. En Estados Unidos, las pérdidas asociadas a la industria de la producción de carne son de aproximadamente 800 millones de dólares anuales. Los veterinarios no han podido eliminar o prevenir totalmente esta enfermedad, debido a que no se ha logrado entender completamente su patogenia (Weekley, 1995; Trigo y col., 2005)

Asimismo, en Estados Unidos de América y Canadá, esta enfermedad es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. De un 80% a 90% de becerras en el hato, se ven afectadas por brotes severos, aunque el índice de mortalidad es por lo general menor al 5% (Pijoan, y col., 1999).

Estudios serológicos realizado en hatos lecheros de la costa de Lima, Perú, evidencian que los animales están siendo expuestos a virus neumotrópicos y los casos fatales generalmente se asocian a infecciones por *Pasteurella* spp. En el Departamento de Lima, Perú, se utilizaron veinte casos de neumonías agudas de bovinos procedentes de centros de engorda con la

finalidad de investigar los agentes etiológicos. Encontrado mas aislamientos de *P. multocida* que de *Mannheimia haemolytica* (Zanabria, y col., 2000).

Mientras que estudios realizados en *Kansas State University*, utilizando aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* mediante un estropajo nasal y un raspado transtraqueal en terneros individualmente con señales clínicas de enfermedades respiratorias bovinas, la identificación de cada uno de los pares fueron bioquímicamente y serológicamente identificados. La similitud obtenidos de un estropajo nasal y de un estropajo transtraqueal eran comparados utilizando un ribotipo y análisis de susceptibilidad de antibióticos. Los resultados de este estudio sugieren que un cultivo del estropajo nasal es genéticamente idéntico con el organismo que causa enfermedad dentro del pulmón para 70% de los terneros. Desde un punto de vista terapéutico, las susceptibilidades antibióticas de los aislamientos son similares aunque pueden tener perfiles del ribotipificación diferentes (Derosa y col., 2000).

Pasteurella multocida tipo B es responsable de la septicemia hemorrágica del ganado (rumiantes, búfalos y recientemente en cerdos) de África, el Medio Oriente y Asia, y el tipo E en el Oeste de África, África Central y Sur, también tiene relación con la septicemia hemorrágica; su distribución geográfica no abarca México (García, y col., 1988; Townsend, y col., 1998).

En la región de Tijuana, Baja California, México, se estudiaron 100 becerras afectadas con procesos neumónicos en un total de 12 establos localizados en las cuencas lecheras de la ciudad de Tijuana. Teniendo como resultado 59 aislamientos de *Pasteurella* spp; el principal patógeno observado

en 34 muestras de 10 establos fue *P. multocida*, seguido de *M. haemolytica* registrado en 31 animales de 9 establos, y el resto de otras bacterias (Pijoan, y col., 1999).

Así mismo, los datos sobre prevalencia de neumonías en ovinos varía según el país de procedencia, tipo de explotación, edad de los animales y época del año. Se estima que la tasa promedio de prevalencia en corderos fluctúa de 10 a 40%, tanto en México como en el extranjero (Trigo y col., 1986; Blanco Viera y col., 1993).

En una amplia revisión bibliográfica, Yates (1982) menciona la poca frecuencia de aislamientos de cepas de biotipo T (T3, T4 y T10) de *Pasteurella trehalosi*, a partir del aparato respiratorio de los bovinos ya que estos biotipos han sido aislados de corderos con pasteurelisis septicémica y de fosas nasales de borregos y cabras clínicamente sanos (Yates, 1982; Jaramillo, y col., 1987). Con respecto a los serotipos de *Pasteurella multocida*, Yates (1982) menciona que el tipo A, está asociada comúnmente con la neumonía en bovinos mientras que el tipo D sólo se encuentra en infecciones esporádicas (Yates, 1982).

JUSTIFICACION.

De acuerdo a los antecedentes descritos anteriormente, fue necesario hacer un estudio en la cuenca lechera de la Comarca Lagunera, por motivos de que hay pocos estudios que indiquen la situación actual de frecuencias y aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos Holstein clínicamente sanos de neumonías en establos de la Comarca Lagunera en el periodo invierno - primavera de 2004 (enero-abril).

Objetivos específicos.

- 1) Identificar aislamientos de *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, o ambas, a partir de hisopos nasales obtenidos de bovinos Holstein clínicamente sanos en hatos lecheros de la Comarca Lagunera.
- 2) Determinar la frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, o ambas a partir de hisopos nasales obtenidos de bovinos Holstein clínicamente sanos de neumonías en hatos lecheros de la Comarca Lagunera.

MATERIAL Y METODOS.

Marco de Referencia.

La Comarca Lagunera está localizada al norte-centro de México, exactamente al suroeste de Coahuila y en colindancia con el noreste de Durango. Comprende por el Estado de Coahuila, los municipios de Torreón, Matamoros, Francisco I. Madero, San Pedro de Las Colonias y Viesca; y por el Estado de Durango, los municipios de Gómez Palacio, Lerdo, Tlahualilo de Zaragoza, Mapimi, San Pedro del Gallo, San Luis Cordero, Rodeo, Nazas, Cuencamé de Ceniceros, General Simón Bolívar y por ultimo San Juan de Guadalupe (comarcalagunera.com).

Actualmente la Comarca Lagunera es el segundo lugar a nivel nacional en producción de leche bovina después de Jalisco; contando con más de 440.876 mil cabezas de ganado bovino y una producción de leche al cierre anual del 2004 de 1879.42 millones de litros de leche (SAGARPA, 2005).

Procedimiento.

Se desarrolló un estudio de tipo descriptivo, prospectivo y transversal, dividido en dos fases. El tamaño de muestra ($n= 24$ establos) se decidió mediante un diseño de muestreo no aleatorio por conveniencia. En la fase de campo, desarrollada de enero a abril del año 2004, el muestreo en los 24 hatos lecheros se llevó a cabo en forma aleatoria, tomándose el 2 % del total de cada hato, dentro del cual el 70 % fue en animales menores de un año y el 30% en animales mayores de un año.

Se muestrearon animales que no presentaron evidencias clínicas de neumonías y se aplicó un cuestionario al médico encargado de cada establo (anexo), con el propósito de identificar la edad del animal y la condición de salud del mismo.

El alojamiento de los animales menores de 1 año, 22 de los 24 establos muestreados se encontraron en corraletas al aire libre, uno dentro de nave y otro en corral. Todos los establos tuvieron manejo adecuado de calostro y vacunación, datos a los cuales no se les dio seguimiento en esta investigación.

Obtención de muestras.

Se obtuvieron muestras de secreción nasal con hisopo estéril¹ con medio Stuart y carbón activado, los cuales se conservaron en refrigeración por no más de 24 horas hasta su llegada al laboratorio para llevar a cabo el aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

La fase de laboratorio se realizó en la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en la Unidad Laguna.

Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

Las muestras se sembraron en cajas de agar sangre (Fig.1) en un lugar estéril y con mecheros, se incubaron durante 24 horas a 37° C; se identificaron colonias de *Mannheimia haemolytica* y/o *Pasteurella multocida* mediante sus características: para *Mannheimia haemolytica*, con forma de rocío de lluvia, con coloración grisáceas, circulares y algunas presentaban hemólisis; mientras que

¹ Copan Venturi Transystem, Copan Italia, 1-25125 Brescia, Italy

las colonias de *Pasteurella multocida* son mas grandes, brillosas y mucoides. Posteriormente a la identificación de las colonias se realizaron las pruebas de tinción de Gram, posteriormente la prueba de oxidasa. Al ser oxidasa positiva se realizaron las pruebas bioquímicas de crecimiento MacConkey, producción de indol, catalasa y nitratos.

Por ultimo al identificar a las bacterias *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* se resembraron las colonias para obtenerlas puras por medio de siembra en estría cerrada (figura 4) y posteriormente incubarlas en viales con infusión cerebro-corazón, y congelarlas a menos 40° C.

Técnicas de siembras en medios de cultivo utilizadas para la identificación de posibles colonias de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

figura1. Siembra para aislamiento en cultivo puro.

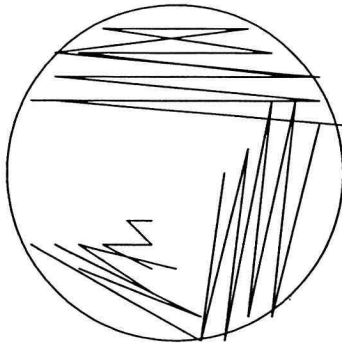


Figura 2. Picadura con asa recta.

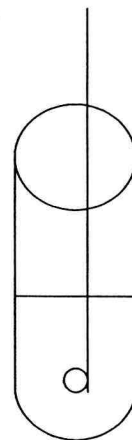


Figura 3. Siembra por picadura en el fondo del tubo y en estría sobre la superficie del medio.



Figura 4. Siembra en estrías cerrada.



RESULTADOS.

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante estadísticas descriptivas a través de frecuencias en relación a la edad.

En los hatos estudiados (n= 24) en la cuenca lechera de la Región Lagunera fueron muestreados 1165 animales clínicamente sanos de neumonías. De los estudios microbiológicos se recuperó *Mannheimia haemolytica* en 39 casos (3.34%) y *Pasteurella multocida* se encontró en 33 casos (2.83%); obteniendo un total de 72 muestras positivas (6.18%) a partir de hisopos nasales.

Con el propósito de determinar si habían diferencias significativas en las frecuencias de los aislamientos de *M. haemolytica* y *P. multocida*, según los grupos etáreos, se realizó la prueba de Chi cuadrada.

Las frecuencias de aislamiento de *M. haemolytica* y de *P. multocida* en los bovinos menores de 1 año (4.1% y 3.6% respectivamente) fueron significativamente mayores que en los mayores de 1 año (1.46% y 0.8%) ($p < 0.05$).

Del total de animales muestreados, no hubo diferencias significativas en los aislamientos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Relación de hatos lecheros muestreados en la Comarca Lagunera para el aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

Nº UP.	Total animales	< 1 año	> 1 año	Total
1	2900	39	19	58
2	3450	47	22	69
3	4200	60	24	84
4	4250	63	22	85
5	900	12	6	18
6	300	4	2	6
7	1000	15	5	20
8	1900	26	12	38
9	1050	14	7	21
10	4900	76	22	98
11	1500	21	9	30
12	800	12	4	16
13	1500	21	9	30
14	4000	55	25	80
15	2500	33	17	50
16	2100	28	14	42
17	2150	31	12	43
18	4350	60	27	87
19	3400	50	18	68
20	2000	28	12	40
21	2500	35	15	50
22	3050	43	18	61
23	1050	13	8	21
24	2500	37	13	50
Total	58250	823	342	1165

Cuadro 3. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en Bovinos Holstein clínicamente sanos de la Comarca Lagunera.

Nº UP	Total de n	Aislamientos					
		Mh	%	Pm	%	Total	%
24	1165	39	3.3	33	2.8	72	6.2

Cuadro 4. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos mayores de 1 año.

N° UP	Total de n	Aislamientos					
		<i>Mh</i>	%	<i>Pm</i>	%	Total	%
24	342	5	1.4	3	0.8	8	2.4

Cuadro 5. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bovinos menores de 1 año.

N° UP	Total de n	Aislamientos					
		<i>Mh</i>	%	<i>Pm</i>	%	Total	%
24	823	34	4.1	30	3.6	64	7.7

DISCUSIÓN.

Tradicionalmente se ha descrito que la neumonía afecta a becerras de 2 a 5 meses de edad (Curtis y col. 1988), aunque en estudios mas recientes se ha encontrado que las becerras pueden verse afectadas por procesos neumónicos desde las dos semanas de edad, con mayor riesgo de enfermarse en la cuarta y quinta semana de vida (Virtala y col. 1996), hasta la décima semana (Sivula y col. 1996).

En el presente estudio se corroboró que las becerras lecheras corren mayor peligro de contraer neumonía antes del primer mes de edad, sin que al parecer esto tenga relación con el tipo de alojamiento en el que se encuentran los animales, como resultado podría decirse que la neumonía en becerras lecheras puede causar una pérdida económica severa de muy diversas formas en algunos establos.

La mayoría de los patógenos del Complejo Respiratorio Bovino (CRB) son comensales de los animales clínicamente normales en el ganado adulto. Clínicamente el CRB es producto de los efectos de estrés que causa inmunosupresion y qué permite inevitablemente la colonización del tracto respiratorio por patógenos oportunos encontrados. El desafío infeccioso sólo juega un papel menor en el desarrollo de CRB (Cusack y col. 2003).

García y col. (1988) con el propósito de analizar la presencia de patógenos oportunistas, en animales sanos, tomaron 500 hisopos de tonsilas al momento de la matanza para intentar el aislamiento. Como resultado se obtuvo el aislamientos de 5 cepas de *Pasteurella multocida*. De acuerdo al número de aislamientos, encontramos resultados similares a los de García y col. (1988)

donde observamos que una posible causa del bajo número de aislamientos es que los animales pudieron ser tratados con antibióticos, con el objetivo de prevenir la pasteurelosis o fiebre de embarque, lo cual se presenta cuando los animales son sometidos a situaciones de estrés, confinamiento y situaciones diversas que los predispone a padecer dicha enfermedad.

Por otra parte, en cuarenta terneros diagnosticados con CRB clínico que fueron muestreados de cavidad nasal y raspado transtraqueal cada uno, se recuperaron 38 aislamientos de bacterias. En resumen las bacterias recuperadas usando ambas técnicas prueban que los patógenos bacterianos recuperados de muestras nasales y los raspados transtraqueales iguales. Cada procedimiento probado demostró la misma frecuencia, aproximadamente 10 %, de obtener una cepa negativa (De Rosa y col., 2000).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que los índices de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* fueron significativamente mayor en bovinos jóvenes, menores de 60 días, que en adultos. De igual forma se encontró un mayor número de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* que de *Pasteurella multocida*.

Pocos son los estudios encontrados que prueben la presencia de estas bacterias en animales sanos, de hecho no se encontraron trabajos similares y la mayoría de los estudios son a partir de animales enfermos y los resultados son diferentes. Zanabria y col. (2000) en un estudio encontraron una mayor cantidad de aislamientos de *Pasteurella multocida* que de *Mannheimia hemolítica*. Ellos utilizaron veinte muestras de neumonías agudas de bovinos procedentes de centros de engorda con la finalidad de investigar los agentes etiológicos. En el

55 % de los casos (n=11) se aislaron microorganismos del género *Pasteurella*. De éstos, el 73 % (n=8) correspondió a *P. multocida* y el restante (n=3) a *P. haemolytica*. Cuando se utilizaron exudados nasales como fuente de recuperación de las bacterias, los aislamientos se elevaron a 70 % (n=14), con predominancia de *P. multocida* (n=9) y los 5 restantes *P. haemolytica*.

De igual forma Pijoan y col. (1999) cita a *Pasteurella multocida* como la bacteria más comúnmente aislada en un estudio realizado en ganado bovino de Tijuana, Baja California, México, concluyendo que por si sola, produce una enfermedad clínica y una lesión pulmonar menos severa que *Pasteurella haemolytica*.

Es importante señalar que a diferencia del estudio realizado por Pijoan y col. (1999) donde menciona que los índices de mortalidad más elevados se encontraron en aquellos establos que mantuvieron a sus crías en corrales colectivos, o en forma individual dentro de algún tipo de edificio, en nuestro estudio no fue significativo el alojamiento de los animales ya que la mayoría de estos se encontraban en jaula individual.

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en esta investigación nos muestran que.

1. *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* son mas frecuentes de encontrar en bovinos jóvenes que en adultos.
2. *Mannheimia haemolytica* es mas frecuente que *Pasteurella multocida* en animales sanos.

LITERATURA CITADA.

1. **Aguilar R. F., Alfonseca S. E.** (2003). Manual de prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinaria. Departamento de Microbiología e Inmunológica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 92 - 94, 142, 148, 153, 155, 157.
2. **Ackermann M. R., Brogden A. K., Florance F. A. and Kehrlí M. E., jr.** (1999). Induction of CD18-Mediated Passage of Neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in Pulmonary Bronchi and Bronchioles. 67(2) : 659-663.
3. **Angen O., Mutters R., Caugant A. D., Olsen E. J. and Bisgaard.** (1999). Taxonomic relationships 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 glucosida* sp. Nov. , *Mannheimia ruminalis* sp. Nov. and *Mannheimia varigena* sp. Nov. International journal of sistematic bacteriology 49: 67-86.
4. **Argueta G. J., Mercado P. M. y Trigo T. F.** (1988). Frecuencia de *Pasteurella Hemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Vet. Méx. 19: 93-97.
5. **Biberstein, E.L.** (1978). Biotyping and Serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Bergan, T. and Norris, J.: Methods in Microbiology. New York. Academic Press. Inc. 10: 253
6. **Blackall, P.J., Fegan N., Chew T. I. and Hampson J. D.** (1998). Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia., *Microbiology*, 144, 279-289.
7. **Blanco Viera J. F., Trigo J. F., Jaramillo M. L. y Aguilar R. F.** (1995). Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* Isolated from Pneumonic Lesion in cattle and Sheep from Mexico. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 37:121-126.
8. **Blanco Viera J. F., trigo T. F., Jaramillo M. L., Aguilar R. F., Tapia P. G. y Suárez G. F.** (1993). Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet. Méx. 24(2):107-112.
9. **Breider M. A., Kumar S. and Corstvet R. E.** (1991). Protective Role of Bovine Neutrophils in *Pasteurella haemolytica* - Mediated Endothelial Cell Damage. 59(12): 4570-4575
10. **Cardoso. M. V., Sforsin A. J., Scarcelli E., Teixeira S. R., Miyashiro S., Campos E. R. y Genovez M. E.** (2002). Importância do diagnóstico diferencial em um surto de pneumonia enzoótica bovina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo. (3):111-113.
11. **Chapter.** (2005). Haemorrhagic septicaemia. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
12. **Clavijo, A. M., Alfaro C., Rolo M., Díaz C., Santander J. y Coa P.** (2002). Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos de cepas de *Pasteurella*

multocida aisladas de terneros con neumonía en el estado monagas, Venezuela. 12:626-629.

13. **Cusack PMV., McMeniman N. and Lean I. J.** (2003). The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. 81:480-487.
14. **Curtis y col. 1988., Virtala y col. 1996., Sivula y col. 1996. Referido por Pijoan A. P. y Chavez D. J.** (2003). Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. Vet. Mex. 34 (4) 333 - 342.
15. **Davies R. L., Whittam T. S. and Selander R. K.** (2001). Sequence Diversity and Molecular Evolution of the Leukotoxin (*lktA*) Gene in Bovine and Ovine Strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Journal of Bacteriology. 183 (4):1394-1404.
16. **Davies R. L., MacCorquodale R., Baillie S. and Caffrey B.** (2003). Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. Med Microbiol 5:59-67
17. **Derosa D. C., Mechor G. D, Staats J. J., Chengappa, M. M. and Shryock T. R.** (2000). Comparison of *Pasteurella* spp. Simultaneously Isolated from Nasal and Transtracheal Swabs from Cattle with Clinical Signs of Bovine Respiratory Disease. 38 (1):327-332.
18. **De la Rosa R.** (2004). Frecuencia de neumonías bacterianas en bovinos de complejo agropecuario industrial de Tizayuca (CAIT), Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
19. **Fagliari J. J.** (2003). Estudio clínico y de laboratorio de Pneumonia de becerros inducida por inoculación intrabronquial de *Mannheimia haemolytica*. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 55: 1 -10.
20. **Glynn H., Miller M. W., Ward C. S.** A Review of *Pasteurella* Pneumonia in Domestic and Wild Sheep. Appendix J. Pag. 1-38.
21. **García H. E., Trigo F. J., Sánchez M. H. y Aguilar R. F.** (1988). Serotipos de *Pasteurella multocida* en bovinos productores de carne en México. Vet. Méx. 19: 199 - 204.
22. **Gibbs H.A., Allan E.M. and Wiseman, A.** (1984). Experimental production of bovine pneumonic *pasteurellosis*. Res. Vet. Sci. 37: 154-166.
23. **Highlander S. K.** (2001). Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. Frontiers in Bioscience Baylor College of Medicine, Department of Molecular Virology and Microbiology, One Baylor Plaza, MS BCM280, Houston, TX 77030. 6: 1128-1150,
24. **Hodgson P. D., Aich P., Manuja A., Hokamp K., Roche F. M, Brinkman F. S., Potter A., Babiuk L. A. and Griebel P. J.** (2005). Effect of stress on viral-bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. 6: 244-250.
25. **Hsuan S. I., Kannan M. S., Jeyaseelan S., Prakash Y. S., Sieck G. C., and Maheswaran S. K.** (1998). *Pasteurella haemolytica* a1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. 66(6):2836-2844.

26. **Jaramillo M. L., Aguilar R. F. y Trigo J. F.** (1987). Serotipificación de *Pasteurella Haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. *Vet. Mex.* 18: 185 - 188.
27. **Kodjo A., Villard L., Bizet C., Martel J. L., Sanchis R., Borges E., Gauthier D., Maurin F. O. and Yves.** (1999). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Is More Efficient than Ribotyping and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis in Discrimination of *Pasteurella haemolytica* Strains. 37(2): 380-385.
28. **Kehrenberg C., Schulze G., Martel J., Chalus E., Schwarz S.** (2001). Review Resistencia antimicrobiana en *Pasteurella* y *Mannheimia*; epidemiología y la base genética. *Vet. Res.* 32: 323 - 339.
29. **Lafleur R. L., Abrahamsen M. S. and Maheswaran S. K.** (1998). The Biphasic mRNA Expression Pattern of Bovine Interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* Lipopolysaccharide-Stimulated Alveolar Macrophages Is Primarily due to Tumor Necrosis Factor Alpha. 66(9): 4087-4092 .
30. **Maheswaran S. K., Kannan M. S., Weiss D. J., Reddy K. R., Townsend E. L., Yoo H. S., Lee B. W. and Whiteley L. O.** (1993). Enhancement of Neutrophil-Mediated Injury to Bovine Pulmonary Endothelial Cells by *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. 61(6): 2618-2625.
31. **Merchant, I.A. and Pecker, A.A.** (1994). *Bacteriología y Virología Veterinarias*. Ed. Acribia, España. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. American Society for Microbiology. Washington, D.C. P. 348.
32. **Morales Á. J., Jaramillo M. L., Oropeza V. Z., Tórtora P. J., Trigo T. F. y Espino R. G.** (1993). Evaluación experimental de un inmunogeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Vet. Méx.* 24 (2): 97-105.
33. **Narayanan S.** (2002). Leucotoxins of gram-negative bacteria. *Vet. Microbiol.* 84: 337 - 356.
34. **Peterson R. R.** (1997). Detection of Antibodies to *Pasteurella multocida* by Capture Enzyme Immunoassay Using a Monoclonal Antibody against P37 Antigen 35: 208-212.
35. **Pijoan A. P., Aguilar R. F. y Morales A. F.** (1999). Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet. Méx.* 30 (2): 149 - 155.
36. **Pijoan A. P. y Aguilar R. F.** (2000). Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus* aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana.
37. **Quinn P. J., Markey B. K., Carter M. E., Donnelly W. J., and Leonard F. C.** (2003). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Editorial Blackwell Publishing. Pag. 137 - 143.
38. **Timoney J. F., Gillespie J. H., Scott F. W. and Barloungh J. E.** (1988). Hagan and Brumer's *Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. Eighth Edition. Comstock Publishing Associates. 104-116.
39. **Townsend k. M., frost J. A., Lee W. C., Papadimitriou M. J. and Dawkins J. S.** (1998). Development of PCR Assays for Species- and

- Type-Specific identification of *Pasteurella multocida* Isolates.36(4):1096-1100.
40. **Townsend k. M, Jing J. D., Chung F. A. and Adler B.** (2001). Genetic Organization of *Pasteurella multocida cap* Loci and Development of a Multiplex Capsular. 39(3): 924-929.
 41. **Trigo F. J. y Romero M. J.** (1986). La relevancia de las neumonías como causa de la mortalidad en corderos. Vet. Mex. 17: 116 -119.
 42. **Trigo F.** (1987). El complejo respiratorio infecciosos de los bovinos. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 18 - 22.
 43. **Trigo, F. J.** (1991). Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. Vet. Mex. XXII (2) 131 -134.
 44. **Trigo T. F. y González C.** (2005) Avances sobre la Patogenia de la Neumonía Bovina Producida por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Memorias XXVII Congreso Nacional de Buiatria . Acapulco Guerrero.
 45. **Seleim S. R.** (2005). REVIEW: Major pathogenic components of *pasteurella multocida* and *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. Bacteriology Department, Animal Health Research Institute, Nadi El-Seed St. Dokki, 12311 Cairo, Egypt.
 46. **Starr A. E., Dan T., Minhas K., Shewen P. E., and Coomber B. L.** (2004). Potential Involvement of Gelatinases and Their Inhibitors in *Mannheimia haemolytica* Pneumonia in Cattle. Infection and Immunity. 72(8):4393-4400,
 47. **Watts J. I., Yancey R. J., Salmon A. S. and Case A. C.** (1994). A 4-Year Survey of Antimicrobial Susceptibility Trends for Isolates from Cattle with Bovine Respiratory Disease in North America. 32: 725-731.
 48. **Weekley, L.B. and Veit, H.P.** (1995). Potential morphologic and physiologic factors that may predispose the bovine lung to respiratory disease. Compend Contin Educ. Prac. Vet. 17: 974-983.
 49. **Yates, W. D. G.** (1982). Review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral – bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can. J. comp. Med. 46: 225 - 263.
 50. **Zanabria, V., Rivera H. y Rosadio R.** (2000). Patología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima Perú. Rev. Inv. Vet. 11: 169 - 187.
 51. **Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y alimentación** (2005). Servicio e Información de Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA. Avance Mensual. Disponible en: <http://www.sagarpa.com.mx>.
 52. <http://www.comarcalagunera.com/portal/laguna/comarca.php>

ANEXO.

Cuestionario para la toma de muestras de los diferentes establos.

(1) No. Registro:

(2) Fecha y hora del muestreo:

(3) Nombre y número de Establo:

(4) Datos del Animal:

4.1. Edad:

4.2. Sexo (M) (H)

4.3. Procedencia (Local) (Traslado)

(5) Alojamiento:

5.1. (1. Dentro de naves) (2. Corraletas al aire libre) (3. En corral)

5.2. Su área de recría es: (1. Establo) (2. Corral de área de recría)
(3. Nave de área de recría)

(6) Suministro de calostro:

6.1. (SI) (NO)

6.2. A partir de cuantas horas de nacido: (0. Después de la primera hora)
(1. A la primera hora) (2. No se sabe).

(7) Vacunación:

7.1. (0. SI) (1. NO) (2. No se sabe)

7.2. Contra que enfermedades

(8) Movilización:

8.1. (0. Sin movilización) (1. Con movilización)

8.2. Cuando fue la última movilización

(9) Antibioterapia:

9.1. (0. SI) (1. NO)

9.2. Que medicamentos

9.3. Cuál fue la causa

Instrucciones de llenado del cuestionario del Anexo I.

1.- número de cuestionario. Debe corresponder en el orden en que se tomaron las muestras de los animales.

2.- fecha del muestreo. Se anotó el día, el mes, el año exacto en que se tomaron las muestras de cada uno de los animales.

3.- nombre y número de establo. Anotar el nombre y número de establo donde se tomaron las muestras.

4.- datos del animal.

4.1 edad.- Anotar la edad exacta del animal (día, mes y año)

4.2 sexo.- Identificar si es macho o hembra el animal a muestrear.

4.3 procedencia.- Se debe anotar la procedencia del animal.

5.- si el animal es becerro se tomara en cuenta a todo animal que este dentro del rango de 0 a 14 meses de edad.

5.1.- alojamiento anotar si el becerro se encuentra dentro de naves, en becerreras o si se encuentra en corrales junto a parideros.

5.2.- ¿su área de recría es?

Anotar si el becerro se encuentra dentro de naves, en becerreras o si se encuentra en corrales junto a parideros.

6.- suministro de calostro.

Anotar si se le dio o no suministro de calostro al animal, si la respuesta es afirmativa, a partir de cuantas horas de nacido se le dio el calostro.

7.- vacunación.

¿Esta vacunado?

Anotar si el animal ha sido vacunado y contra que enfermedades han sido vacunados (IBR, *Brucelosis*, *Leptospirosis*, *Pasteurelisis* y DVB).

8.- movilización.-

Anotar si el animal ha sido movilizado o no y cuando fue la ultima movilización (día, mes y año)

9.- Antibioterapia.-

Anotar si el animal ha recibido tratamiento medico.

¿Cuál fue la causa?

Anotar la enfermedad y al signología que motivo el tratamiento.