



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Frecuencia de aislados de *Mannheimia haemolytica* en ovinos aparentemente sanos, procedentes de 6 municipios del Estado de México”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Saturnino Miguel Cejudo Rojas

ASESORES:

M en C. Pomposo Fernández Rosas
Dr. en C. Humberto Gustavo Monroy Salazar
M. V. Z. Héctor Hernández Mercado

REVISORES:

Dr. Valente Velázquez Ordóñez
M en C. Soledad Díaz Zarco



Toluca, Estado de México, Noviembre de 2017.

Agradecimientos:

En hora buena, a mi facultad nacida hace cuarenta y cinco años y no se pueda hablar de la fundación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, sin antes mencionar al M. V. Z. Humberto Gómez Escamilla, piedra angular de esta institución, hombre clave y un símbolo del Médico Veterinario Zootecnista.

Al M. en C. Pomposo Fernández Rosas, mi director de facultad, mi profesor académico y ahora mi director de tesis a quien guardo profundo respeto y cariño por entregar todo y más de lo que está a su alcance sin egoísmo alguno.

A mis asesores: por haber tenido la calma para enseñarme a retomar el camino para poder realizar este trabajo de investigación.

A Ino, Moy, Josué, Aarón y María Inés, por el apoyo que cada quien me dio para lograr el objetivo programado.

Eternamente agradecido estoy de todos ustedes.

Saturnino Miguel Cejudo Rojas

Dedicatorias

A DIOS: por haberme dado unos padres que se dieron cuenta y que supieron que la única forma de superación personal es la preparación.

A MIS PADRES Miguel e Inés: porque en su lucha diaria me vieron nacer y crecer para irme forjando, entregándome todo lo necesario día a día hasta verme realizado, como persona y como profesionalista.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de tesis forma parte del
proyecto de investigación:

“Diagnóstico de las principales
enfermedades ligadas a la mortalidad de
crías ovinas y alternativas de control”

Clave 2388/2006E

Título

“Frecuencia de aislados de ***Mannheimia haemolytica*** en
ovinos aparentemente sanos, procedentes de 6
municipios del Estado de México”.

Índice

Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
Financiamiento.....	iii
Título.....	v
Índice.....	vi
Índice de cuadros	vii
Índice de gráficas	viii
Resumen.....	viii
Introducción	1
Revisión de literatura	3
Justificación	13
Hipótesis.....	14
Objetivos	15
Material	16
Método	18
Método estadístico	20
Límite de tiempo	21
Límite de espacio	22
Resultados	23
Discusión.....	32
Conclusiones	34
Sugerencias	35
Literatura citada	366

Índice de cuadros

Cuadro 1. Frecuencia de muestreo de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, para aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> , por municipio.	23
Cuadro 2. Hisopados positivos y prevalencia por municipio, de aislados de <i>Mannheimia haemolytica</i>	25
Cuadro 3. Índice de positividad a <i>Mannheimia haemolytica</i> , de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, por municipio y sexo.....	28
Cuadro 4. Cuadro de contingencia para análisis de riesgo por sexo.	29
Cuadro 5. Resultados de X^2	30
Cuadro 6: Distribución de hisopados positivos a <i>Mannheimia haemolytica</i> , por municipio, sexo y edad.	31

Índice de gráficas

Gráfica 1. Frecuencia de muestreo de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, para aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> , por municipio.	24
Gráfica 2. Hisopados obtenidos y aislamientos positivos a <i>Mannheimia haemolytica</i>	26
Gráfica 3. Prevalencia de <i>Mannheimia haemolytica</i> , por municipio.....	27
Gráfica 4. Índice de positividad para <i>Mannheimia haemolytica</i> , por sexo.	29
Gráfica 5. Prueba de Chi cuadrada.	30

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de aislados de la bacteria *Mannheimia haemolytica* en ovinos aparentemente sanos de seis municipios del Estado de México (Calimaya, Capulhuac, Ixtlahuaca, Jiquipilco, Texcalyacac y Xalatlaco).

Se tomaron 183 hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, que se transportaron en medio de Stuart para su procesamiento. Se utilizó como medio de cultivo agar sangre para el aislamiento de bacterias con actividad hemolítica.

Se realizó la resiembra de las colonias que presentaron hemolisis, para obtener cultivos puros, para identificar y confirmar se realizaron pruebas bioquímicas convencionales (SIM, MIO, UREA, TSI, INDOL y OXIDASA).

Una vez identificados bioquímicamente, los aislados fueron inoculados en infusión cerebro corazón, BHI por sus siglas en inglés y se dispensaron en criotubos para su conservación en ultracongelador a - 82°C.

En este trabajo se determinó la positividad y prevalencia de los hisopados nasales a *Mannheimia haemolytica* por municipio, sexo y edad; siendo Jiquipilco el municipio con la prevalencia más alta de 69% y Calimaya el municipio de menor prevalencia con 24%.

Los resultados de este trabajo nos indican que el sexo y la edad de los animales, no son factores determinantes para la positividad de los hisopados nasales a *Mannheimia haemolytica*.

Palabras clave: frecuencia, aislados, *Mannheimia haemolytica*, ovinos, aparentemente sanos.

Introducción

M. haemolytica es la bacteria más patógena asociada a problemas neumónicos en ovinos. Es la primera más importante y la segunda después de las enfermedades gastrointestinales en ovinos y bovinos menores de un año.

Es habitante normal de la nasofaringe, la inmunosupresión por estrés y las infecciones por virus respiratorios propician el establecimiento y la multiplicación en el tejido pulmonar.

Entre las enfermedades infecciosas del ganado, las de origen respiratorio son la causa principal de pérdidas; en animales jóvenes el 25% de ellos experimentan un episodio de enfermedades respiratorias durante el primer año, con variables del 14 al 38%, más frecuente en la etapa previa al destete.

Las neumonías ocasionan el 75% de los casos clínicos y provocan del 45 al 55 % de mortalidad y su tratamiento llega a representar hasta el 8% de los costos de producción.

La muerte perinatal, postnatal y las pérdidas económicas causadas son de consideración; lo que es un grave problema económico en la producción ovina a nivel mundial. En el Reino Unido, la mortalidad de corderos es la causa principal de pérdidas en la producción ovina.

En México la muerte perinatal de corderos tiene una frecuencia del 15 al 30% que se asocia con una alimentación deficiente de las hembras durante la gestación y lactación. Las instalaciones, prácticas de manejo inadecuadas y factores ambientales que causan estrés.

El síndrome respiratorio de ovinos es una de las causas de mortalidad perinatal de importancia en muchos países, así como los efectos productivos en la ganancia de peso

y su menor eficiencia en la conversión alimenticia, en ovinos afectados con problemas de neumonía crónica.

La prevalencia de neumonía varía según la región, tipo de explotación, edad de los ovinos y época del año. La tasa de prevalencia en corderos estimada en México fluctúa entre el 10 y el 40% (Blanco *et al.*, 1993).

M. haemolytica es el agente etiológico de problemas respiratorios que causan pérdidas económicas en varias especies animales como: bovinos, ovinos, caprinos, aves, conejos, equinos, pavos. *M. haemolytica* es responsable de la fiebre de embarque o Pasterelosis bovina (Seleim, 2005); además; septicemias, mastitis, pleuroneumonías en bovinos, neumonía séptica de corderos, mastitis, artritis y meningitis en ovinos (Songer y Post, 2005).

Revisión de literatura

Mannheimia haemolytica

Historia

M. haemolytica es un cocobacilo gram negativo, no móvil, no esporulado, fermentativo, oxidasa-positivo, anaerobio facultativo (Quinn, 1994). Es un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, género *Mannheimia*. Primero fue llamado *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt en 1885, fue renombrado *Pasteurella haemolytica* en 1932 por su carácter hemolítico en placas de agar con sangre de ovino (Rice *et al.*, 2008).

En 1885; Theodore Kitt la nombro *Bacterium bipolare multocidum*.

En 1896: Flugge la nombró *Bacillus bovisseptica*.

En 1932: Neuson and Cross como *Pasteurella haemolityca*.

En 1959: Smith la clasifica en dos biotipos, A y T.

En 1960: Biberstein y col. Desarrollaron un sistema de tipificación por medio de haemoaglutinacion indirecta (HAI).

En 1990: se le nombró *Pasteurella trehalosi*.

Y hasta 1999 se reclasificó como *Mannheimia haemolytica* por medio de ribotipificación por Angen y cols.

Taxonomía

El nuevo género *Mannheimia* fue establecido en 1999 para incluir a los miembros trehalosa negativos del complejo de *Pasteurella haemolytica*. Todas las cepas en el género fermentan manitol, pero no D-mannosa, es una clave para diferenciar

Mannheimia spp. de los miembros del género *Pasteurella*. Las cinco especies actuales en el género *Mannheimia* son *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis*, *Mannheimia glucosida*, *Mannheimia ruminalis* y *Mannheimia varigena* (Angen *et al.*, 1999).

Clasificación serológica

Mannheimia haemolytica fue históricamente clasificada en 17 serotipos, basada en hemaglutinación indirecta de antígenos de superficie capsular. Los microorganismos fueron clasificados adicionalmente en dos biotipos A y T, basado en la habilidad para fermentar los azúcares L-arabinosa o trehalosa, respectivamente. Las cepas biotipo T serotipos 3, 4, 10 y 15 han sido recientemente reclasificadas como una especie separada, *Pasteurella trehalosi*. El serotipo A11 es ahora *M. glucosida*, y las cepas biotipo A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16, y A17 (12 serotipos), permanecen como *Mannheimia haemolytica* (Songer y Post, 2005). Actualmente *Pasteurella trehalosi* ha sido reclasificado en un nuevo género, *Bibersteinia*, como *Bibersteinia trehalosi* comb. Nov., basado en pruebas fenotípicas y genotípicas (Blackall *et al.*, 2007).

Cultivo y morfología de las colonias

En agar sangre, las colonias son: finas, de tamaño pequeño con crecimiento central pequeño; en medios con sangre de ovino, equino y conejos, las colonias bacterianas presentan un crecimiento circular, rodeadas por una estrecha zona de beta-hemólisis, pero en placas de agar sangre realizadas con sangre de ovejas jóvenes se incrementa la zona de beta-hemólisis, en la parte interna la hemólisis es completa, mientras que en la parte externa es parcial, pero incrementa su tamaño durante la incubación. *Mannheimia* es muy diferente de *Pasteurella* por su crecimiento en agar MacConkey con colonias de rosa a rojas (Tefera y Samola, 2001). Los miembros del género *Mannheimia* son cocobacilos gram negativos con un diámetro de 0.2 y 0.5 x 1.2 a 2.0 micras, cocobacilos o bacilos anaerobios facultativos o microfílicos (Hirsh *et al.*, 2004).

Diagnóstico de *M. haemolytica*

El diagnóstico está basado en el aislamiento bacteriológico a partir de animales con signos clínicos respiratorios. Las bacterias son bacilos pequeños y cocobacilos gramnegativos, no móviles. En agar sangre de ovino, la morfología de las colonias son lisas, grisáceas, beta hemolíticas y con un diámetro de 2 mm después de 24 horas de incubación (Ewers *et al.*, 2004).

Patogenia

Para iniciar la infección, los patógenos bacterianos deben primero, ser capaces de colonizar un tejido blanco apropiado en el hospedero (Beachey, 1981). Este tropismo, en asociación con la habilidad de la bacteria para romper las barreras mucosales e invadir al hospedero, distingue a los microorganismos patógenos de los comensales. La colonización se inicia con la unión de la bacteria a los receptores expresados por las células que forman la pared de la mucosa. Ciertas especies de bacterias están restringidas en términos de los hospederos, de los tejidos que ellos infectan y de las enfermedades que ellos causan. Uno de los mecanismos mejor conocidos de adherencia bacteriana es la unión mediada por estructuras celulares de superficie llamadas pilis o fimbrias. Las pilis son estructuras largas y flexibles extendidas en el exterior de la superficie de muchas especies de bacterias y permiten el contacto entre la bacteria y la célula hospedera (Wizemann *et al.*, 1999).

La función de la adhesión bacteriana determina la colonización, por unirse al receptor molecular de la superficie celular del hospedero (Adamu, 2007). Las adhesinas, están compuestas de polipéptidos (proteínas) o polisacáridos (carbohidratos o azúcares). Las adhesinas proteicas se dividen en dos grupos: fimbrial y afimbrial. En el fimbrial, solo se conoce un pili (Wilson *et al.*, 2006).

M. haemolytica tiene dos tipos de fimbrias flexibles demostradas en bacterias cultivadas *in vitro*, con una longitud de 12nm y un grosor de 5nm; *in vivo* fueron

observadas estructuras similares especialmente cuando las bacterias se recuperaron de fluidos de becerros infectados natural o experimentalmente, y en microorganismos adheridos al epitelio traqueal en becerros naturalmente infectados, las características son similares, en animales infectados de manera natural. La adherencia se da a células epiteliales tráqueales; las fimbrias tienen una característica de 35Kd (Ragy, 2003).

Virulencia

M. haemolytica es el agente etiológico más común de la pasterelosis neumónica, ocasiona septicemia y mastitis, y es considerado uno de los patógenos más importantes de ovinos, cabras y bovinos (Kirkan y Kaya, 2005). *M. haemolytica* es el agente etiológico primario de la pasterelosis neumónica, una afección respiratoria importante en vacas y ovejas. La pasterelosis neumónica bovina, en la mayoría de los casos, es causada por *M. haemolytica* serotipo A1. En las ovejas las infecciones son por los serotipos A:2, A:5, A:6, A:7, aunque con un incremento de la prevalencia (Ewers *et al.*, 2004). En México se han identificado en ovinos los serotipos A8, A2, A1, A6 y A5 (Blanco *et al.*, 1993).

Los miembros del género *Mannheimia* producen un número de sustancias asociadas con la virulencia de este grupo de microorganismos, la especie con mayor índice de virulencia es *M. haemolytica*, siendo uno de los principales agentes patógenos en vacas, ovejas y cabras. Entre las sustancias importantes producidas por *M. haemolytica* están: la cápsula, lipopolisacáridos, leucotoxina y otros como proteínas de membrana externa, adhesinas, plásmidos, enzimas de hialuronidasa y neuroaminidasa (Tefera y Samola, 2001).

Cápsula

La cápsula juega en papel importante en la patogénesis, evita la fagocitosis y protege a la membrana externa contra la respuesta del hospedero, por la activación del sistema de complemento mediante la producción de hierro (Hirsh *et al.*, 2004).

Los polisacáridos de la cápsula de *M. haemolytica* están implicados como mediadores en la resistencia contra los mecanismos de defensa del hospedero: fagocitosis por neutrófilos y macrófagos alveolares, facilitando la formación de microcolonias en la neumonía (McKerral y Lo, 2002).

La estructura de la cápsula fue identificada como un polisacárido producido durante la fase logarítmica de crecimiento, y puede ser visualizada en la bacteria crecida *in vitro* e *in vivo* (Ragy, 2003). Los polisacáridos capsulares han sido implicados en la patogénesis de la mannheimiosis. El papel de los polisacáridos en la virulencia de numerosos patógenos gramnegativos han sido bien documentados; estos incluyen la adherencia, prevención de la desecación y resistencia a las defensas del sistema inmune del hospedero. La composición de los polisacáridos de *M. haemolytica* A1 está compuesto por disacáridos repetidos de ácido N-acetilmannosamianurónico unido a N-acetilmannosamina (Adamu, 2007).

Aislamientos acapsulares han sido ocasionalmente reportados, pero sus bases genéticas no han sido bien estudiados. Ahora que los genes han sido clonados, las técnicas moleculares son usadas para crear mutantes capsulares. Además, ha sido reportado que el mutante acapsular de *M. haemolytica* fue más fácilmente fagocitado que las cepas capsulares. El material capsular puede interactuar con el líquido surfactante pulmonar, facilitando de ese modo la adherencia local del microorganismo, a diferentes células del hospedero (Wilson *et al.*, 2006).

Lipopolisacáridos (LPS)

Los lipopolisacáridos representan del 10-15 % del peso de *M. haemolytica*. Dos genes potencialmente involucrados en la biosíntesis de *M. haemolytica* han sido clonados y caracterizados (Adamu, 2007).

Otro factor crítico de virulencia es el lípido A componente de los lipopolisacáridos de la pared celular de la bacteria. El lípido A es el responsable de los efectos endotóxicos,

tales como pirexia, activación de macrófagos, liberación del factor de necrosis tumoral inducción de shock hipotensivo y juega un papel en las lesiones vasculares en tejidos de pulmones afectados. Además los LPS forman complejos con la leucotoxina, por lo cual puede incrementar su citotoxicidad (Rice *et al.*, 2008). Aunque han sido reportados como el principal determinante antigénico, los títulos de anticuerpos para LPS no correlacionan con la resistencia para la neumonía experimental (Confer *et al.*, 1990).

Los LPS son el mayor componente de las bacterias gramnegativas; la estructura básica de los lipopolisacáridos de *M. haemolytica* reportan similitud a los de otras bacterias gramnegativas. Constituyen el 10-15% del peso de *M. haemolytica* (Li y Clinkenberard, 1999). El lipopolisacárido consta de tres regiones: polisacárido O, núcleo polisacárido y lípido A une el lipopolisacárido con la doble capa fosfolipídica. El lipopolisacárido O también se conoce como antígeno O (del alemán Ohne hauch, sin película) (Vadillo *et al.*, 2002).

Los lipopolisacáridos de la pared celular consisten, en un complejo lípido, denominado lípido A, responsable de la toxicidad, al cual se fija un polisacárido responsable de la antigenicidad, constituido por un centro y una serie terminal de unidades repetitivas que forman una especie de piel molecular sobre la superficie celular y representa un antígeno principal de superficie de la célula bacteriana, denominado antígeno O (Stanchi *et al.*, 2007).

En el transcurso de la infección, desencadena en el hospedador la síntesis de anticuerpos específicos, lo que permite en muchas ocasiones y mediante el empleo de determinadas técnicas inmunológicas, poner de manifiesto a la bacteria. Contribuye en alguna medida a impedir la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares del hospedero. El lípido A es un glucofosfolípido que se comporta como mitógeno de células B; es el elemento tóxico para ciertas células del hospedero y contribuye a la activación del complemento por la vía alterna; su principal función es ocasionar la sepsis de la bacteria (Vadillo *et al.*, 2002).

Leucotoxina

Entre los factores de virulencia producidos por *M. haemolytica* uno de los más importantes es una leucotoxina extracelular de 100 a 104 kDa de peso; la leucotoxina se produce durante la fase logarítmica de crecimiento (Atapattu y Czuprynski, 2005). *M. haemolytica* es frecuentemente encontrada en las criptas tonsilares y en el tracto respiratorio superior de ganado saludable. En conjunción con infecciones virales activas y factores de stress, *M. haemolytica* migra a los pulmones donde se multiplica rápidamente (Confer *et al.*, 1990).

La leucotoxina extracelular es considerada la más importante, responsable del daño de los leucocitos en los pulmones. La leucotoxina induce lisis y degranulación de neutrófilos que han sido implicados como las causas primarias de la inflamación aguda característica de la pasteurellosis neumónica. La leucotoxina es una glicoproteína de 102-kDa, la cual es producida durante la fase logarítmica de crecimiento bacteriano *in vitro*. La leucotoxina corresponde a la familia de toxinas RTX (por sus siglas en inglés, repeats in toxins) y posee una amplia homología con las exotoxinas producidas por otras bacterias gramnegativas tales como *E. coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. A pesar de la amplia homología compartida por la familia de toxinas (RTX), éstas poseen una marcada dicotomía entre los miembros de la familia con respecto a la especificidad de las células blanco. Las toxinas secretadas por *E. coli* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* lisan eritrocitos y células nucleadas incluyendo los leucocitos de diferentes especies; en contraste la toxina producida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* para leucocitos de primate y la leucotoxina de *M. haemolytica* es específica para macrófagos alveolares, neutrófilos y leucocitos de rumiantes (Deshpande *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2001).

La leucotoxina produce numerosos efectos biológicos. Estos incluyen efectos citotóxicos sobre los leucocitos de vacas, ovejas y cabras (en alta concentración de

leucotoxina), actuación de leucocitos (en baja concentración), muerte de leucocitos por apoptosis, disminución en la regulación de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) en la superficie de los macrófagos, afectando su habilidad para presentar el antígeno. La activación de los macrófagos causa liberación de citoquinas proinflamatorias e interleucina- I, y la estimulación de los leucocitos polimorfonucleares primero para la liberación de H₂O₂, el cual en turno es convertido por células endoteliales alveolares en presencia de Fe en radicales hidroxilo. Los radicales hidroxilo matan a la célula, provocando la acumulación de fluido edematoso y fibrina (Biberstein y Dwight, 1999; Murphy *et al.*, 1995).

La leucotoxina es la responsable de provocar la inflamación, edema, necrosis de los pulmones afectados (Gioia *et al.*, 2006); causa lisis de macrófagos celulares, neutrófilos, en bovinos y en conejos provoca la lisis de glóbulos rojos, con la pérdida de la defensa permite la colonización bacteriana e iniciando con las lesiones patológicas en todo el aparato respiratorio inferior (inflamación pulmonar) (Rensburg *et al.*, 2006).

Exotoxinas

Las toxinas son armas biológicas proteicas o no proteicas, producidas por la bacteria o por las células dañadas del hospedero. Las toxinas de las bacterias gramnegativas y grampositivas son mediadores centrales en el shock séptico, en una condición así, a menudo la situación es fatal porque es el resultado de la acción combinada de citocinas, cascada de complemento, y componentes de la cascada de la coagulación (Wilson *et al.*, 2006).

Enzimas extracelulares

M. haemolytica serotipo A1 produce la enzima neuraminidasa, pero no el biotipo T (*Bibersteina threalosi*), se conoce además una pequeña hemolisina desde hace tiempo; aunque no existen reportes de una hemolisina de mayor tamaño similar a otras hemolisinas de bacterias gramnegativas; esta pequeña hemolisina actúa liberando

hemoglobina de los eritrocitos causando lisis celular; esta neuraminidasa producto de *M. haemolytica* es importante en la colonización; es producida por los serotipos de *M. haemolytica* (Ragy, 2003).

Plásmidos

Está demostrado que *M. haemolytica* contiene plásmidos que han ocasionado la resistencia a los antimicrobianos. La presencia de plásmidos en *M. haemolytica* se demostró en el serotipo A1 (Ragy, 2003).

En un estudio realizado en establos de Tijuana, Baja California, sobre la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de 31 cepas de *M. haemolytica*, se demostró una tasa elevada de resistencia (más del 80%) contra kanamicina o lincomicina (Aguade y Aguilar, 2000).

Signos y lesiones

Los signos clínicos pueden variar desde inaparentes hasta una condición fatal. Las manifestaciones son depresión, anorexia, fiebre elevada (42 °C), incremento de la frecuencia cardíaca, pérdida de peso y rinitis. Con frecuencia se observa lagrimeo y tos, con incremento de la frecuencia respiratoria en las primeras etapas y posteriormente con disnea. La auscultación revela estertores anteroventrales y bronquiales progresivos, los becerros pueden encontrarse con los codos abducidos, el cuello extendido y algunos animales pueden presentar diarrea (Zecchinon *et al.*, 2005).

Las lesiones pulmonares son lobulares, distribuidas anteroventralmente y caracterizadas por infiltración extensiva de neutrófilos y exudación de fibrina en las vías aéreas y alvéolos. Los septos interlobulillares se encuentran distendidos con material gelatinoso y contienen edema, fibrina, leucocitos y los conductos linfáticos se encuentran distendidos. Los bronquios tienen paredes normales aunque puede existir necrosis y descamación de las células epiteliales. Estos contienen comúnmente los

productos de los procesos inflamatorios más importantes: debris necrótico, leucocitos y fibrina. Al corte la superficie presenta diversos colores, además de hemorragia, infartos, necrosis y solidificación del tejido tanto en la etapa aguda, fluída y congestiva de la enfermedad (hepatización gris). El término consolidación se utiliza más comúnmente ahora para cambios exudativos. Las vías menores se encuentran inflamadas, empezando por los bronquiolos terminales. Los alvéolos contienen edema, fibrina y ocasionalmente hemorragias en proporciones variables, los aspectos más interesantes son las células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos) y las áreas de necrosis de coagulación. Estas últimas son multifocales y pueden involucrar lobulillos completos o confluentes, pero no lóbulos completos. La importancia de la necrosis se produce por la citolisis de los neutrófilos y macrófagos que drenan una variedad de compuestos tóxicos (enzimas, histamina, prostaglandinas) que agravan el daño pulmonar (Zecchinon *et al.*, 2005).

Justificación

La enfermedad respiratoria en ovinos, se caracteriza por ser un proceso infeccioso agudo que causa importantes pérdidas económicas, debido a la elevada mortalidad de corderos y reducción de la ganancia de peso, afectando la conversión alimenticia de los animales enfermos, además de tratamientos costosos entre los animales sobrevivientes. El patógeno de mayor importancia causante de la enfermedad respiratoria es *M. haemolytica*. Dada la alta incidencia de ovinos afectados en la ovinocultura regional y nacional, es necesario determinar la frecuencia de *M. haemolytica*, en ovinos aparentemente sanos. Los resultados obtenidos en el presente estudio, brindan información sobre el papel de portadores de los ovinos con aislamiento positivo y la posible transmisión horizontal a la progenie. Lo cual contribuirá para la toma de decisiones sobre las medidas de control y prevención de las neumonías causadas por *M. haemolytica*.

Hipótesis

Es factible obtener aislados de *Mannheimia haemolytica* de ovinos aparentemente sanos, procedentes de 6 municipios del Estado de México.

Objetivos

Objetivo general:

Determinar la frecuencia de aislados de *Mannheimia haemolytica* a partir hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, procedentes de 6 municipios del Estado de México.

Objetivos particulares:

- Obtener hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos.
- Caracterizar fenotípicamente los aislados obtenidos.

Material

Material biológico:

183 hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos

Aislados de *M. haemolytica*

Cepa de referencia: *M. haemolytica* ATCC 4425, serotipo A1 y (American Type Collection Culture).

Medios de cultivo:

Base de Agar Sangre (DIFCO)

Infusión Cerebro Corazón (DIFCO)

Agar MacConkey (DIFCO)

Glicerol

Pruebas Bioquímicas:

TSI

SIM

MIO

Urea

Carbohidratos diversos

Reactivos:

Oxidasa

Catalasa

Kovac

Cristal violeta o violeta de genciana

Yodo

Alcohol

Acetona

Safranina

Equipo:

Estufa bacteriológica odds ratio

Microscopio Boeco Germany

Método

Características de la población

Se procesaron 183 hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, de diferentes unidades de producción procedentes de 6 municipios del Estado de México. Los ovinos fueron de rebaños de origen nacional.

Toma de muestras:

La toma de muestras se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante de los hisopos.

Bacteriología:

El proceso técnico para el cultivo de las muestras se realizó de acuerdo con Biberstein y Dwight (1999). Las muestras se inocularon en placas agar sangre y en agar MacConkey e incubaron durante 24 hrs. a 37 °C.

Las colonias obtenidas se seleccionaron por sus características fenotípicas (aspecto, color gris y carácter hemolítico).

Se realizaron pruebas bioquímicas convencionales previa purificación de los cultivos para la identificación de los aislamientos (Mutters, 1985).

Aislamiento e identificación de *M. haemolytica*.

Las muestras de hisopados nasales se inocularon en placas de agar sangre (preparadas con 10 % de sangre de carnero) e incubadas a 37 °C durante 24 hrs. La identificación fenotípica de las colonias fue hecha por la apariencia típica de *Mannhemia* spp. Se les realizó métodos convencionales como tinción de Gram y pruebas bioquímicas (oxidasa, fermentación de carbohidratos, producción de ácido sulfhídrico, motilidad, producción de indol, ureasa y fermentación de trehalosa. Las colonias seleccionadas

fueron subcultivadas en agar sangre, incubadas a 37 °C durante 24 hrs., obteniéndose los cultivos puros de cada aislado.

Mantenimiento y congelación

Una vez identificados los aislados de *M. haemolytica* obtenidos en los estudios bacteriológicos, se propagaron en infusión cerebro corazón (BHI) y se dispensaron en criotubos para su conservación en ultracongelador a -82 °C.

Método estadístico

Se usó un diseño experimental completamente al azar y los resultados se analizaron con estadística descriptiva, con descripción con tablas, frecuencias y gráficas correspondientes, se realizó un análisis con tabla de contingencia de 2x2 para evaluar la relación de variables de riesgo por sexo con prueba de Chi cuadrada, con un intervalo de confianza del 95% y una $P < 0.05$.

Límite de tiempo

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del periodo de Enero del 2016 a Enero del 2017.

Límite de espacio

El trabajo se llevó a cabo en el área aves del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, situado en el Km 15.5 de la carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, coordenadas, latitud norte 19° 23' 57", latitud oeste 99° 42' 47".

Resultados

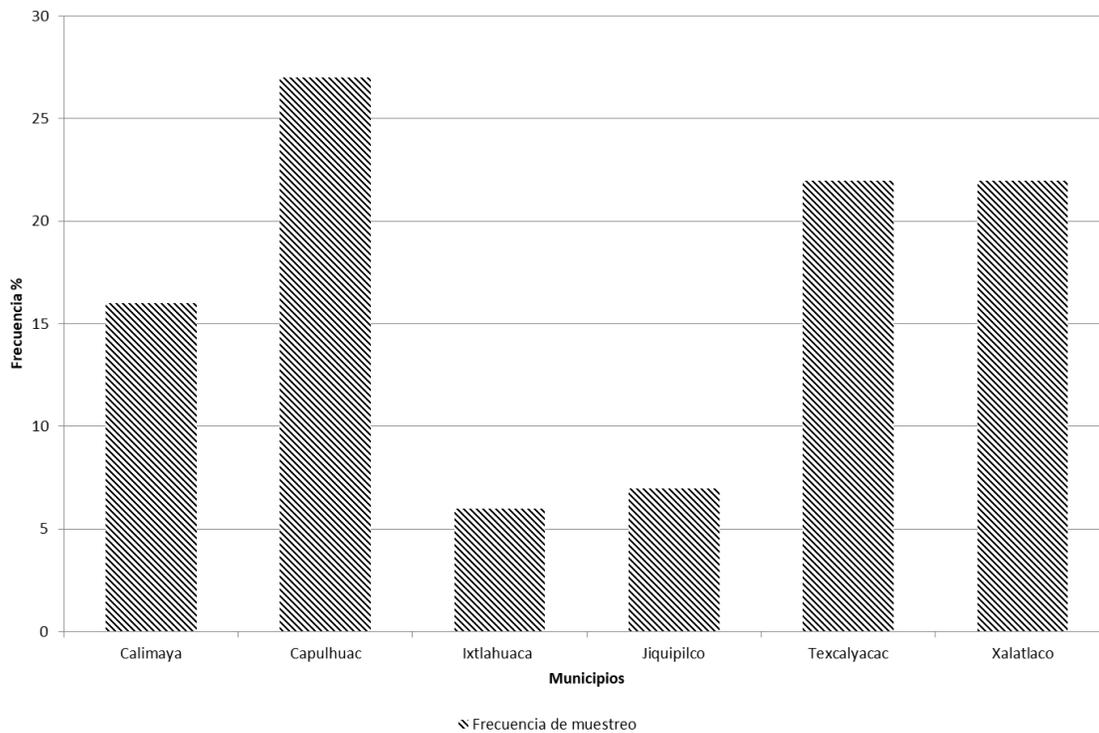
Los resultados obtenidos en el presente estudio se evaluaron a partir un total de 183 hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, correspondientes a seis municipios del Estado de México, que se procesaron para obtener aislados de *Mannheimia haemolytica*, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la FMVZ-UAEMEX, en el cuadro uno se presentan las frecuencias de 183 hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, se identifican por su municipio de origen, los municipios se ordenan de forma alfabética, se presenta también una gráfica de frecuencia.

Cuadro 1. Frecuencia de muestreo de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, para aislamiento de *Mannheimia haemolytica*, por municipio.

Municipio	Frecuencia de muestreo	Frecuencia relativa %	Muestreo acumulado	Relativa acumulada %
Calimaya	29	16	29	16
Capulhuac	48	27	77	43
Ixtlahuaca	11	6	88	49
Jiquipilco	13	7	101	56
Texcalyacac	41	22	142	78
Xalatlaco	41	22	183	100
Total	183	100		

Fuente: Datos originales

Gráfica 1. Frecuencia de muestreo de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, para aislamiento de *Mannheimia haemolytica*, por municipio.



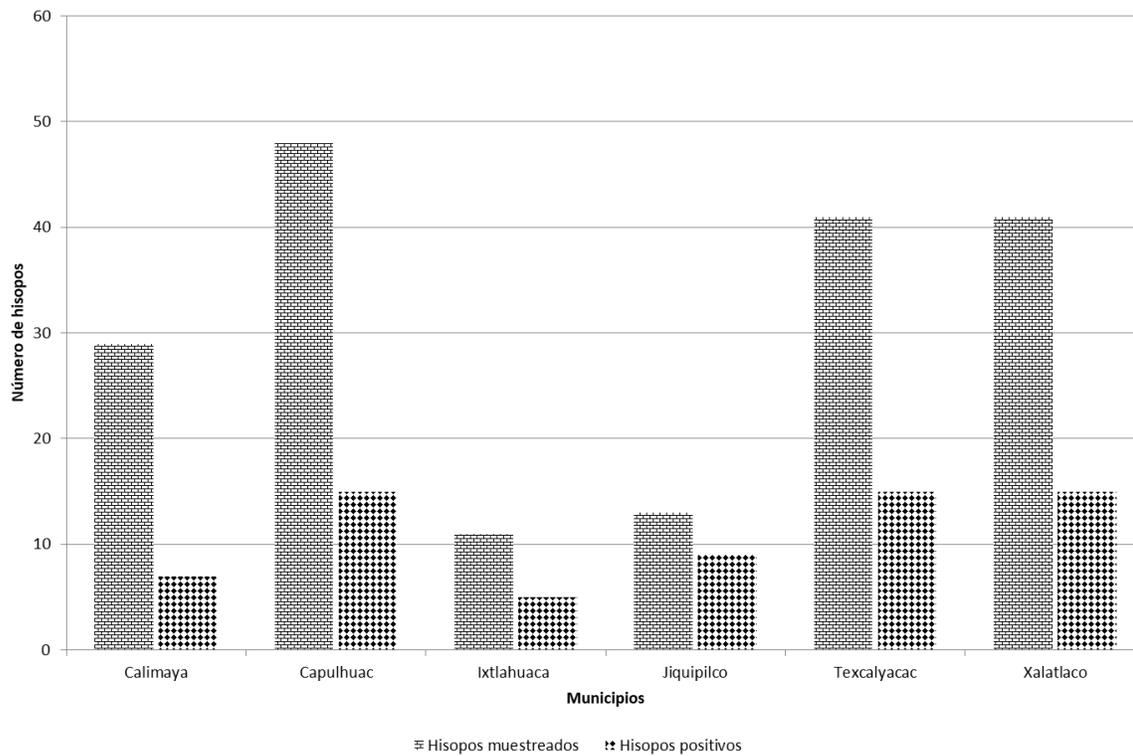
Cuadro 2. Hisopados positivos y prevalencia por municipio, de aislados de *Mannheimia haemolytica*.

Municipio	Hisopados obtenidos	Hisopados positivos	Prevalencia %
Calimaya	29	7	24
Capulhuac	48	15	31
Ixtlahuaca	11	5	45
Jiquipilco	13	9	69
Texcalyacac	41	15	36
Xalatlaco	41	15	36
Total	183	66	36

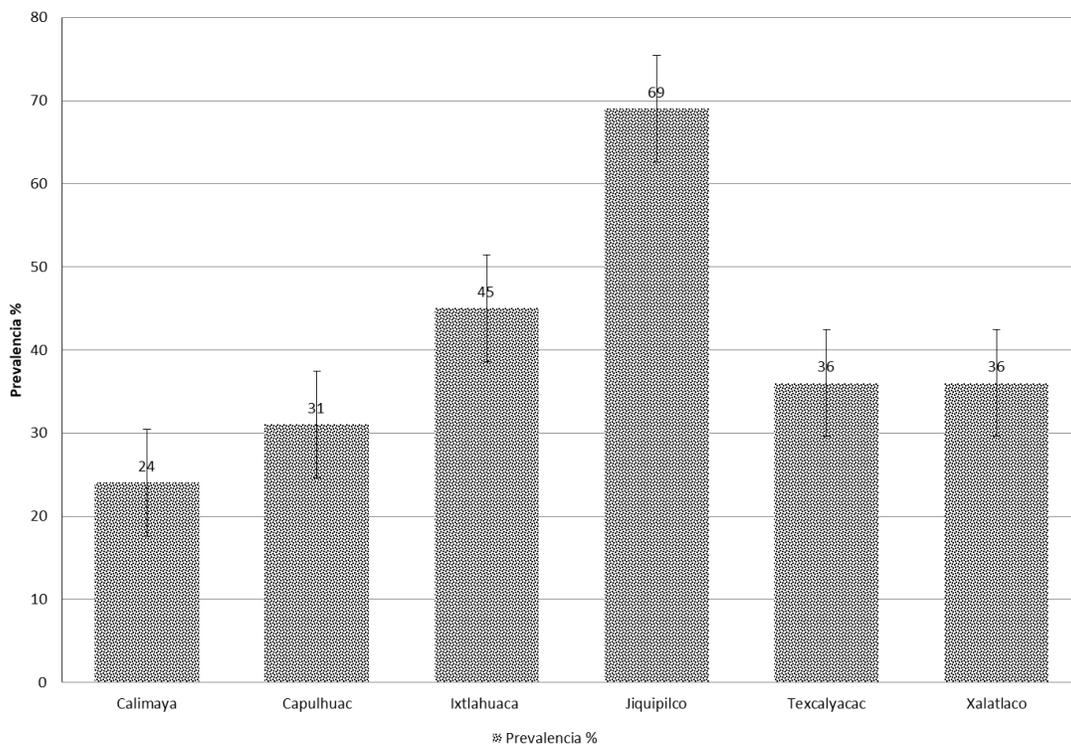
Fuente: Datos originales

El cuadro 2 presenta la frecuencia de aislados positivos a *Mannheimia haemolytica* por municipio, mostrando que de 183 hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, 66 fueron positivos a *Mannheimia haemolytica* en los seis municipios, donde encontramos mayor número de positivos en Capulhuac, Texcalyacac y Xalatlaco, y por otro lado los números más bajos arrojados en el presente estudio los encontramos en Calimaya, Ixtlahuaca y Jiquipilco, representado para los primeros tres municipios un 69% de los casos positivos y para los últimos tres un 31% de los casos positivos (Gráfica 2), la prevalencia por municipio, se observa la más alta en Jiquipilco con un 69%, seguido de Ixtlahuaca con un 45%, en los demás municipios la prevalencia oscila entre el 24 % y el 36%, con una prevalencia para el presente estudio de un 36% (Gráfica 3).

Gráfica 2. Hisopados obtenidos y aislamientos positivos a *Mannheimia haemolytica*.



Gráfica 3. Prevalencia de *Mannheimia haemolytica*, por municipio.



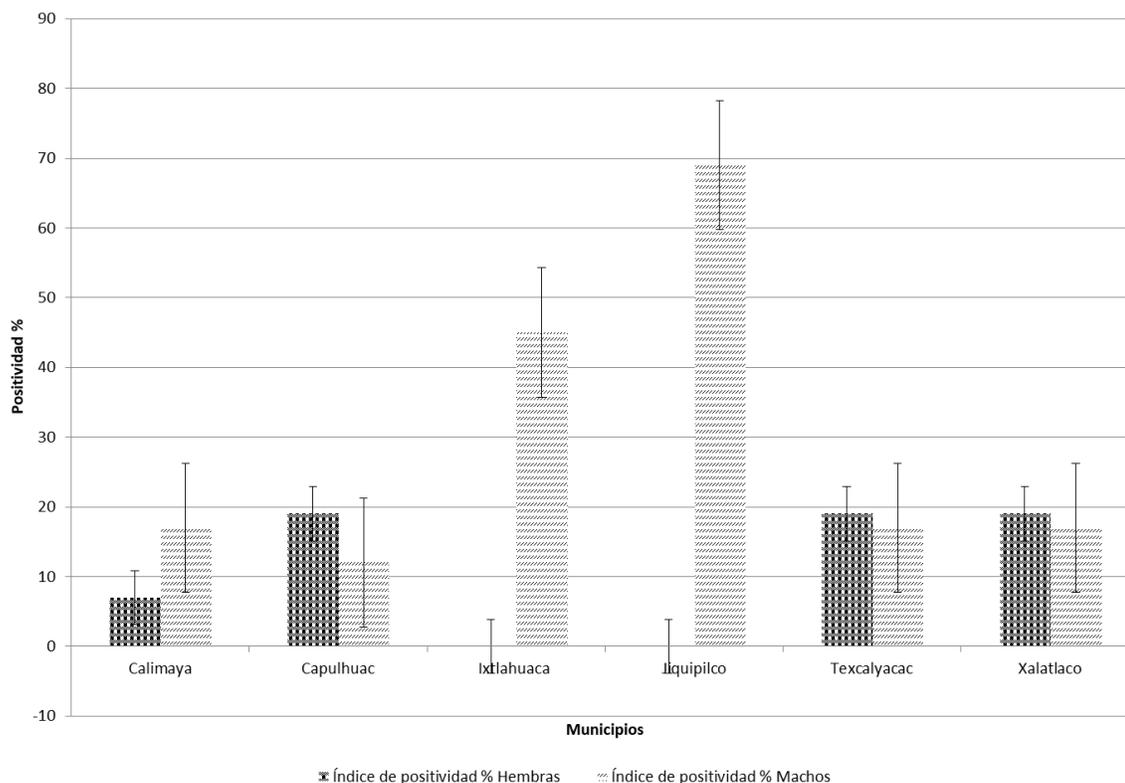
Cuadro 3. Índice de positividad a *Mannheimia haemolytica*, de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, por municipio y sexo.

Municipio	Hisopados obtenidos	Hisopados de hembras positivos	Índice de positividad % hembras	Hisopados de machos positivos	Índice de positividad % machos	Total hisopados positivos	Prevalencia %
Calimaya	29	2	7	5	17	7	24
Capulhuac	48	9	19	6	12	15	31
Ixtlahuaca	11	0	0	5	45	5	45
Jiquipilco	13	0	0	9	69	9	69
Texcalyacac	41	8	19	7	17	15	36
Xalatlaco	41	8	19	7	17	15	36
Total	183	27	15	39	21	66	36

Fuente: Datos originales

El cuadro 3 muestra, que de 183 hisopados nasales, 66 son positivos *Mannheimia haemolytica*, correspondiendo a 27 hembras y a 39 machos, es necesario mencionar que de los resultados negativos fueron 117, 62 corresponden a hembras y 55 a machos (véase cuadro 4) siendo un total de 94 machos y de 89 hembras el universo de estudio del presente trabajo, también se muestra el índice de positividad que fue de 15% para hembras y de 21% para machos, mostrando diferencia significativa entre sexos para los municipios de Jiquipilco e Ixtlahuaca, para los demás municipios no se observa diferencia significativa con un 95% de IC, es decir la prevalencia por sexo resultó de 15% para hembras y 21% para machos, estadísticamente no existiendo una diferencia significativa por sexo, se muestra en la Gráfica 4 el índice de positividad a *Mannheimia haemolytica*, por sexo y municipio.

Gráfica 4. Índice de positividad para *Mannheimia haemolytica*, por sexo.



Cuadro 4. Cuadro de contingencia para análisis de riesgo por sexo.

*Mannheimia
haemolytica*

	Positivos	Negativos	Total
Machos	39	55	94
Hembras	27	62	89
Total	66	117	183

En el análisis estadístico, en cuadro de contingencia de 2X2 en análisis de riesgo por sexo los resultados obtenidos son de 0.92--2.3 con 95% de confianza, lo que interpretamos que no hay diferencia significativa por sexo.

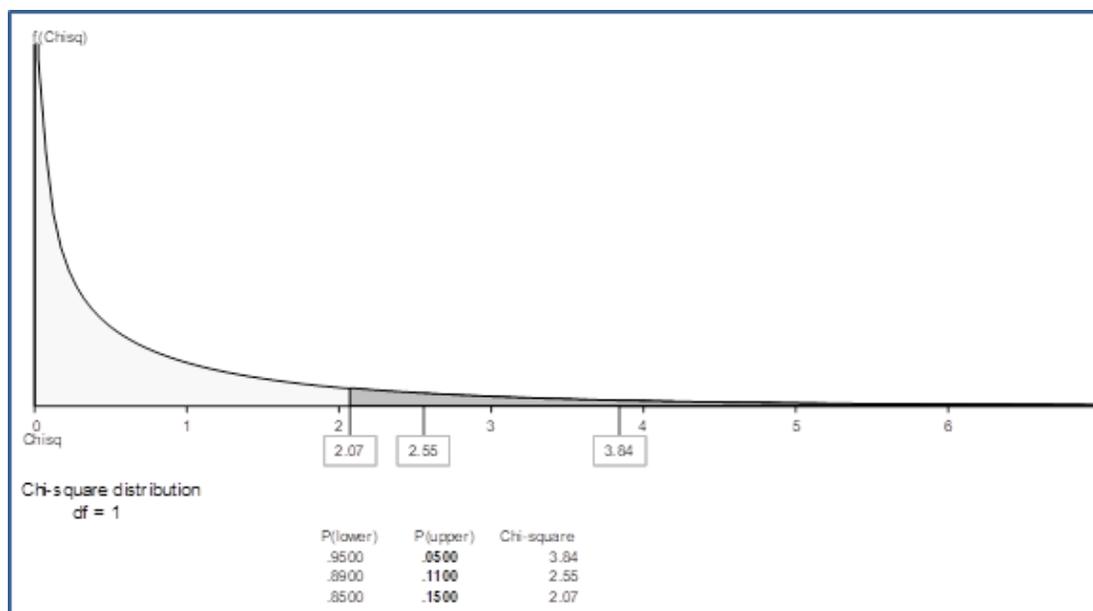
Cuadro 5. Resultados de X².

Prueba Ji-cuadrado de asociación	Estadístico	Valor p
Sin corrección	2.4659	0.1163
Corrección de Yates	2.0059	0.1567

MEGASTAT. Versión 9.1b,

En el factor de riesgo por sexo no existe una diferencia significativa entre machos y hembras, concluyendo que la obtención de hisopados nasales positivos a *Mannheimia haemolytica* no depende del factor sexo, con una confianza del 95%

Gráfica 5. Prueba de Chi cuadrada.



Cuadro 6: Distribución de hisopados positivos a *Mannheimia haemolytica*, por municipio, sexo y edad.

Municipio	Hisopados obtenidos	Hembras		Machos		Total corderos	Total adultos	Total hisopados positivos
		Corderas	Adultas	Corderos	Adultos			
Calimaya	29	0	2	0	5	0	7	7
Capulhuac	48	2	7	4	2	6	9	15
Ixtlahuaca	11	0	0	5	0	5	0	5
Jiquipilco	13	0	0	5	4	5	4	9
Texcalyacac	41	3	5	4	3	7	8	15
Xalatlaco	41	0	8	5	2	5	10	15
Total	183	5	22	23	16	28	38	66

Fuente: Datos originales

De las hembras positivas 5 corresponden a corderas y 22 a ovejas adultas, para los machos positivos, 23 corresponden a corderos y 16 a adultos. Por tanto el número de hisopados nasales positivos a *Mannheimia haemolytica*, en corderos hembras y machos es de 28 y de adultos hembras y machos es de 38, no existiendo diferencia significativa por edad.

..

Discusión.

En el presente estudio se obtuvieron aislados de *Mannheimia haemolytica* a partir de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos procedentes de 6 municipios del Estado de México. Estos resultados son similares a los obtenidos por Poulsen *et al.*, 2006, en un estudio epidemiológico hecho en Noruega, en el cual obtuvieron aislados en cultivo puro de *Mannheimia haemolytica* a partir de hisopados nasales de ovinos aparentemente saludables de 4 rebaños del suroeste de Noruega. Ellos demostraron con su estudio, que un número relativamente elevado de ovinos aparentemente saludables en noruega, parecen ser portadores de *Mannheimia haemolytica* en el tracto respiratorio superior.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo así como lo reportado por Poulsen *et al.*, 2006, demuestran el papel de los ovinos sanos como portadores de *Mannheimia haemolytica* en el tracto respiratorio superior. Y que es muy probable que ocurra lo que describen Narayanan *et al.*, 2002, que usualmente esta bacteria coloniza la parte alta del tracto respiratorio y bajo ciertas condiciones de inmunosupresión del hospedero, *Mannheimia haemolytica* se multiplica rápidamente, invade los pulmones e inicia una infección activa del epitelio alveolar, y por ello consideran a esta bacteria como un agente patógeno secundario.

Murphy *et al.*, 1993, mencionan que dentro de rebaños de ovinos que cursan por una manheimiosis, probablemente haya portadores sanos de la cepa que está causando la neumonía y que es factible aislarla. En nuestro trabajo se obtuvieron aislados de *Mannheimia haemolytica* a partir de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, de rebaños saludables y es probable que éstos actúen como portadores de la bacteria y diseminadores de la enfermedad en su caso.

Ewers *et al.*, 2004, consideran a *Mannheimia haemolytica* como un agente etiológico primario, posiblemente por ser esta bacteria la más frecuentemente aislada de los

procesos neumónicos de los rumiantes domésticos, como es en el caso de los estudios hechos por Odugbo *et al.*, 2003, en Nigeria y por Hernández, 2008, en México, en cuyos trabajos obtuvieron aislados de *Mannheimia haemolytica* a partir de pulmones neumónicos de ovinos, estos autores concluyen que el principal agente involucrado en los problemas respiratorios en ovinos es esta bacteria.

Aunque algunos autores consideren a *Mannheimia haemolytica* como un agente patógeno primario, en este estudio se encontró que esta bacteria puede ser un habitante normal del tracto respiratorio superior de los ovinos, y que puede tener un papel de oportunista dentro de la patogenia de la mannheimiosis. Es decir, el papel de los ovinos sanos como portadores de esta bacteria es muy importante para la perpetuación de la mannheimiosis ovina.

Conclusiones.

En este estudio se obtuvieron aislados de *Mannheimia haemolytica*, a partir de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, en 6 municipios del Estado de México estudiados.

Los resultados de este trabajo sugieren que *Mannheimia haemolytica* puede ser un agente patógeno oportunista, habitante normal del tracto respiratorio superior de los ovinos.

De los 183 hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos, 66 de ellos fueron positivos a *Mannheimia haemolytica*, lo que representa una prevalencia en promedio del 36% de los municipios estudiados.

Jiquipilco fue el municipio con la prevalencia más alta de hisopados nasales positivos a *Mannheimia haemolytica* con 69% y Calimaya obtuvo la prevalencia más baja con 24%.

En este trabajo se encontró que el sexo no es determinante para el aislamiento de *Mannheimia haemolytica* a partir de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos.

En este trabajo se determinó que la edad no es significativa para el aislamiento de *Mannheimia haemolytica* a partir de hisopados nasales de ovinos aparentemente sanos.

Sugerencias.

Se sugiere continuar con estudios bacteriológicos en ovinos sanos, en otros municipios del Estado de México.

Se sugiere hacer serotipificación de los aislados de *Mannheimia haemolytica* obtenidos en este trabajo, así como otros que se obtengan a futuro.

Literatura citada

- Adamu JY. (2007). *Mannheimia haemolytica*: phylogeny and genetic analysis of its major virulence factors. Department of Veterinary Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine University of Maiduguri, Nigeria, 62:6-13.
- Aguade PP, Aguilar RF. (2000). Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, aislados en becerras lecheras en establos de Tijuana. Vet. Méx., 31:153-156.
- Angen Ø, Mutters R, Caugant, DA, Olsen JE, Bisgaard M. (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 granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. International. Journal of Systematic Bacteriology, 49:67-86.
- Atapattu DN, Czuprynski CJ. (2005). *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin Induces Apoptosis of Bovine Lymphoblastoid Cells (BL-3) via a Caspase-9-Dependent Mitochondrial Pathway. Infection and immunity, 73:5504–5513.
- Beachey EH. (1981). Bacterial Adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis., 143:325-345.
- Biberstein EL, Dwight CH. (1999). *Pasteurella*. In Dwight C., Hirsh and Yuang Chung Zee (eds): Vet. Microbiol. Blackwell Sci. Inc., USA.
- Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H, Bisgaard M. (2007). Reclassification of (*Pasteurella*) *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57:666-674.
- Blanco VFJ, Trigo TFJ, Jaramillo ML, Aguilar RF, Tapia PG, Suárez GF. (1993). Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet. Méx., 24:107-112.
- Confer AW, Panciera RJ, Clinkenbeard DK, Moiser DA. (1990). Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. Can. J. Vet. Res., 54:548-542.

- Davies RL, Whittam TS, Selander RK. (2001). Sequence Diversity and Molecular Evolution of the Leukotoxin (lktA) Gene in Bovine and Ovine Strains of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *J. of Bacteriology*, 183:1394-1404.
- Deshpande MS, Ambagala TC, Ambagala APN, Kehrl ME, Srikumaran S. (2002). Bovine CD18 Is Necessary and Sufficient To Mediate *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* Leukotoxin-Induced Cytolysis. *Infection and Immunity*, 70:5058-5064.
- Ewers C, Lübke-Becker A, Wieler LH. (2004). *Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 117:97–115.
- Giogia J, Qin X, Jiang H, Clinkenbeard K, Lo R, Liu Y, Fox GE, Yerrapragada S, McLeod MP, McNeill TZ, Hemphill L, Sodergren E, Wang Q, Muzny DM, Homsy FJ, Weinstock GM, Highlander SK. (2006). The Genome Sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: Insights into Virulence, Natural Competence, and *Pasteurellaceae* Phylogeny. *J. of Bact.*, 188:7257-7266.
- Hernández H. (2008). Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en corderos con signos clínicos de neumonía remitidos al CIESA durante el 2007. Tesis de licenciatura, FMVZ-UAEMEX, Toluca, México.
- Hirsh CD, MacLachlan NJ, Walker RL. (2004). *Veterinary Microbiology*, 2nd ed., Blackwell Publishing, USA.
- Kirkan S, Kaya O. (2005). Serotyping of *Mannheimia haemolytica* strains isolated from pneumonic lungs of sheep in the Aydin regions Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.*, 29:491-494.
- Li J, Clinkenbeard DK. (1999). Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Infection and immunity*, 67:2920-2927.
- McKerral LJ, Lo RYC. (2002). Construction and Characterization of an Acapsular Mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infection and Immunity.*, 70:2622–2629.
- Murphy GL, Robinson LC, Burrows GE. (1993). Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *J Clin Microbiol.*, 31:2303-2308.
- Murphy GL, Whitworth LC, Clinkenbeard KD, Clinkenbeard PA. (1995). haemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immunity*, 63:3209-3212.

- Narayanan S, Nagaraja T, Chengappa M, Stewart G. (2002). Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol.*, 84:337-356.
- Odugbo M, Odama L, Umoh J, Makinde A. (2003). Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from pneumonic lungs of sheep in northern Nigeria. *Small Ruminant Research*, 48:239-243.
- Poulsen L, Reinert T, Sand R, Bisgaard M, Christensen H, Olsen J, Stuen S, Bojesen A. (2006). Occurrence of *haemolytic Mannheimia* spp. in apparently healthy sheep in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48:19.
- Quinn PJ. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe, London.
- Ragy SS. (2003). Review Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. *Gtycobiology*, 10:31-37.
- Rensburg EV, Preez JCD, Ellis CE. (2006). Quantification of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin by indirect ELISA. *Journal of Vet. Res.*, 73:241-250.
- Rice AJ, Carrasco ML, Hodgins CD, Shewen. (2008). *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 8(2):117-128.
- Seleim RS, (2005). Review Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. *Gtycobiology*, 10:31-37.
- Songer GJ, Post KW. (2005). Bacterial and Fungal Agents of Animal Diseases. *Veterinary Microbiology*, 181-191.
- Stanchi ON, Matino EP, Gentilini E, Reinoso HE, Echeverría GM, Leardini AN, Copes, AJ. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Inter-Medica, Argentina.
- Tefera G, Samola J. (2001). *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella sensu stricto* as new genus *Manhemia*: changes in taxonomy. *Vet. Med. - Czech.*, 46:119-124.
- Vadillo S, Pérez S, Mateos E. (2002). *Manual de Microbiología Veterinaria*; McGraw-Hill Interamericana. España., 370-376.
- Wilson WJ, Schurrr MJ, LeBlanc LC, Ramamutrthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. (2006). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Posgrad Medical Journal*, 78:216-224.

Wizemann TM, Adamou EJ, Langermand S. (1999). Adhesin as vaccine development, *Emerging Infection Diseases*, 5(3):395-403.

Zecchinon L, Thomas F, Desmecht D. (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Sciences*, 36:133-156.