

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Pasteurella multocida* serotipo D EN EXPLOTACIONES CAPRINAS

Prestador del Servicio Social: Víctor Antonio Sánchez

Matrícula: 2152028863

ASESORES



Interno. Dr. Javier Lorenzo Olivares Orozco

Número Económico: 6288



Externo. Dra. Gabriela Palomares Reséndiz

Cédula: 6695557

Lugar de Realización:

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (INIFAP-CENID-SAI) Sede Palo Alto.

Fecha de Inicio: 9 de febrero de 2023

Fecha de Término: 9 agosto de 2023

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Agente causal	6
2.2 Vía de transmisión	7
2.3 Factores de virulencia.....	7
2.4 Signología y lesiones	9
2.5 Diagnóstico	9
2.6 Vacunación	10
2.7 Epidemiología	10
3. OBJETIVO	11
3.1 General.....	11
3.2 Específicos	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1 Sitio de muestreo	12
4.2 Muestreo.....	12
4.3 Análisis de muestras.....	13
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSIÓN.....	23
7. CONCLUSIÓN	27
REFERENCIAS	28

RESUMEN

Las limitaciones que enfrenta el sistema de producción caprino son entre otras el bajo ingreso económico, junto con problemas de sanidad, una de las principales amenazas a la actividad son los problemas respiratorios donde no se cuentan con programas de prevención y control. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Pasteurella multocida* serotipo D, en muestras de caprinos con signos de neumonía. Se trabajaron con un total de 156 muestras, las cuales se sembraron en agar sangre y se identificaron mediante pruebas bioquímicas. Además, se llevó a cabo una PCR punto final para la detección de los genes KMT para identificar género y especie, el gen *hyaD-hyaC* para el serotipo A y el gen *dcbF* para el serotipo D. Si bien, en las muestras de campo no se identificó la presencia de *P. multocida*, debido a que las condiciones climáticas no eran favorables durante el periodo de tiempo en que se realizó este estudio; se logró identificar el serotipo D en aislamientos resguardados en laboratorio, por lo que se puede concluir que la importancia de identificar el serotipo capsular radica en ser uno de los principales factores que permite evadir el sistema inmunológico del hospedador por mecanismos que se desconocen, por lo que crear estrategias de prevención basadas en el reconocimiento de componentes en la capsula como biológicos o pruebas diagnósticas se hace necesario y complementario a las ya existentes.

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades agropecuarias constituyen un papel importante en el desarrollo, siendo unidades económicas que proveen de alimento a la población. Sin embargo, muchas son pequeñas independientemente de su perfil productivo y están limitadas por los recursos naturales y el déficit del capital para optimizar sus actividades de producción (Ramos Martinez *et al.*, 2020).

Debido a que la cabra ha demostrado ser capaz de aprovechar la vegetación de las zonas áridas, se ha convertido en una especie ganadera que se adapta y produce en condiciones desérticas obteniendo productos como la carne, la leche y el queso que se consumen y comercializan por las poblaciones (Barrera Perales *et al.*, 2018). En México, los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Coahuila, Puebla y Oaxaca tienen una tradición gastronómica donde se utiliza la carne de este rumiante y cuentan con razas especializadas como Boer y Nubia; mientras que en Coahuila, Guanajuato, Durango, Jalisco y Chihuahua se produce queso, cajeta y dulces las principales razas son la Saanen, Alpina francesa, Toggenburg y Nubia (Palomares Resendiz *et al.*, 2021). El inventario nacional asciende a 8.7 millones de cabezas, que producen 167,000 toneladas de leche y 48,000 de carne, pero en los últimos 10 años ha tenido una tasa de crecimiento de -0.77% (Barrera Perales *et al.*, 2018; SIAP, 2016).

La producción de cabras se asocia a la población rural con menores ingresos, siendo el 80% sistemas de producción de subsistencia, concentrados en estados del norte y centro como Coahuila, Durango y Guanajuato. Este último destaca por ser de los principales productores de leche y abastecimiento de material genético a través de sementales y primas (Santos Lavalle, 2018; Andrade Montemayor, 2017).

Los sistemas de producción extensivos se caracterizan por el uso de amplios terrenos con vegetación arbustiva con potencial forrajero, donde las cabras ramonean libremente con o sin supervisión humana. El pastoreo realizado se hace en búsqueda de mejores pastizales y fuentes de agua, ya que estos son variables debido a los cambios estacionales y climáticos, ocasionando en los animales un estrés nutricional y estacional, por lo que las tasas de producción y reproducción son variables. La inversión en instalaciones es mínima o nula y la mayor parte de mano de obra es familiar (Chávez Espinoza *et al.*, 2022; Martínez Razo *et al.*, 2013).

En los sistemas semi-intensivos se combina el pastoreo de los animales para que ramoneen vegetación natural y durante su confinamiento por las noches se puede

suplementar la dieta con concentrados y forrajes. (Chávez Espinoza *et al*, 2022; Ducoing Watty, 2005)

Mientras que en los sistemas intensivos se les considera como los más eficientes ya que se trabaja en condiciones de estabulación total, lo que incrementa los costos de producción por manejo e infraestructura. La alimentación que se ofrece debe ser equilibrada para lograr altos niveles de productividad de carne y leche. En este sistema se requiere la mejora de los forrajes y una correcta suplementación de granos para evitar desequilibrios nutricionales y se tiene un control sobre la reproducción, lo que garantiza la producción de leche y carne (Chávez Espinoza *et al*, 2018).

Y en el sistema de traspatio los rebaños pertenecen a personas con pocos recursos, por lo que esta actividad constituye su principal fuente de ingresos. A nivel nacional 250 mil familias de las zonas rurales viven de esta actividad (Barrera Perales *et al*, 2018). Los rebaños no son numerosos, la alimentación se lleva a cabo al pastoreo, no se proporcionan suplementos y la productividad es baja (Martínez Razo *et al*, 2013).

Los sistemas de producción también se pueden dividir por el producto obtenido: el cabrito, la cría lechal de 30 días con peso promedio de 10 Kg; el chivo cebado, adultos entre 40 a 45 Kg con edad de 9 meses hasta dos años; y la producción de leche, siendo el cabrito un subproducto de estas explotaciones (Andrade Montemayor, 2017; Díaz Aparacio *et al*, 2015; Cavalloti Vázquez *et al*, 2019).

Las enfermedades infecciosas respiratorias son la principal causa de pérdida de animales jóvenes, ya que 25% de animales experimentan al menos un episodio respiratorio en su primer año. Se estima que las neumonías causan el 75% de los casos clínicos, provocando entre 45 y 55% de mortalidad pese al uso de antimicrobianos, y aunque es de los problemas más frecuentes pocas veces se diagnostica y se establecen medidas preventivas, causando problemas a la ganadería nacional (Palomares Resendiz *et al*, 2021; Ramírez Rico, 2018).

Estas enfermedades son un complejo multifactorial que involucran el estrés, las condiciones ambientales, la respuesta inmune del huésped y los agentes infecciosos. Entre los agentes infecciosos virales más importantes se encuentran la Parainfluenza-3 y el Respiratorio Sincitial que actúan como agentes primarios, ocasionando que las defensas bajen permitiendo que bacterias como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma spp.*, que comúnmente se encuentran en el tracto respiratorio provocando neumonías, que se caracterizan por manifestar fiebres

de 40-41°C, disnea, falta de apetito y anorexia, descargas mucopurulentas nasales y oculares, depresión, postración y muerte (Palomares Resendiz *et al*, 2021; Díaz Aparacio *et al*, 2015)

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Agente causal

El género *Pasteurella* fue nombrado en honor al francés Louis Pasteur, quien aisló por primera vez esta bacteria en la década de 1880 como agente causante de la “choléra des poules”, misma que en su honor fue denominada *Pasteurella multocida*. Desde entonces, esta especie se ha vinculado como agente causante de muchas enfermedades infecciosas en una amplia gama de animales y en humanos. Se encuentra a menudo como parte de la microbiota orofaríngea normal de muchos animales y aves, pero también puede ser un patógeno primario u oportunista de las vías respiratorias superiores e inferiores. En 1985 se reconocieron formalmente tres subespecies de *P. multocida*: *P. multocida* subsp. *multocida*, subsp. *gallicida* y subsp. *séptica* (Peng *et al*, 2019; Soto Ruiz, 2012).

Pasteurella multocida es un coccobacilo gramnegativo pequeño, inmóvil, anaerobio facultativo, que mide aproximadamente 0.3 a 1.0 µm de ancho y de 1.0 a 2.0 µm de largo. Las cepas se pueden aislar en agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro-corazón, complementado con 5 a 10 % de suero de ternero o sangre de caballo u oveja, en condiciones aeróbicas a 37 °C; son oxidasa y catalasa positivos; y pueden fermentar carbohidratos como fructosa, glucosa, xilosa, sorbitol, manosa y galactosa. Las colonias aisladas llegan a medir entre 1 a 3 mm, se observan grisáceas, mucoides, circulares y no producen hemólisis (Peng *et al*, 2019; Figueroa Ochoa *et al*, 2014; Martínez Razo, 2013; Soto Ruiz, 2012).

Los aislamientos de *P. multocida* se clasifican serológicamente en cinco serogrupos capsulares (A, B, D, E y F) y 16 serovares de lipopolisacáridos (LPS) (serovar 1 a 16), utilizando métodos desarrollados por Carter en 1952 y Heddlestone en 1972, respectivamente. Estos métodos de tipificación serológica han sido utilizados en estudios epidemiológicos para determinar los serovares de cepas de *P. multocida* que circulan en diferentes especies hospedadoras y que están asociadas a diferentes tipos de enfermedades (Smith *et al*, 2021; Peng *et al*, 2019).

2.2 Vía de transmisión

Diferentes cepas de *P. multocida* pueden permanecer como parte de las bacterias comensales en la orofaringe de animales sanos, e incluso colonizar las membranas mucosas genitales, respiratorias bajas y del tracto digestivo de varios mamíferos, aves y reptiles. Se sabe que, en aves, puede colonizar fácilmente el tracto respiratorio inferior y de allí pasar a la circulación sistémica con cierta facilidad. En cambio, en mamíferos la colonización en tejido pulmonar requiere que haya factores de estrés que predispongan la invasión del tejido y provocar infecciones locales o sistémicas. La propagación se da a través de la inhalación de aerosoles emitidos por animales infectados, sirviendo como medio de transmisión exógena. Sin embargo, estas bacterias suelen ser muy sensibles a los factores ambientales, por lo que las condiciones climáticas son importantes para la transmisión, siendo las cabras de las especies más afectadas por su comportamiento de rebaño (Rahman *et al*, 2022; Boyce *et al*, 2010).

2.3 Factores de virulencia

Los factores asociados con la patogénesis de *Pasteurella multocida* son las endotoxinas, el lipopolisacárido (LPS), la cápsula, proteínas de membrana externa (PME), fimbria, adhesinas, exotoxinas, plásmidos de virulencia, enzimas extracelulares, proteínas captadoras de hierro (Martínez Razo, 2013).

La estructura del LPS está compuesta por el lípido A altamente hidrofóbico y un esqueleto de oligosacárido de núcleo interno y externo, pero carece de la estructura de antígeno O típica de LPS que se encuentra en otras bacterias Gram-negativas (Peng *et al*, 2019). El LPS tiene la misma función y es de estructura similar al de las endotoxinas de las bacterias gramnegativas: es pirogénico, activa macrófagos, induce activación de factor de tumoración, activa la cascada de coagulación, estimula la inmunidad humoral y es considerado como antígeno protector. Las cepas de *P. multocida* expresan dos glicoformas de LPS (A y B) que difieren en su estructura central interna, mientras que la estructura del antígeno externo varía entre las cepas y se ha clasificado en 16 serovares de LPS diferentes. La protección contra la infección por *P. multocida* parece ser específica del serotipo (Wilson & Ho, 2013; Soto Ruiz, 2012).

La cápsula es una estructura que poseen las bacterias en la superficie, participando en la adherencia a la superficie de las células eucariotas, incrementando la tolerancia

a la desecación, interfiriendo con la fagocitosis y reduciendo la acción del complemento; además tiene la habilidad de unir metales iónicos y aminoácidos cargados positivamente, manteniendo los nutrientes cerca de la célula (Martínez Razo, 2013; Soto Ruiz, 2012). El tipo de enfermedad está relacionado con el tipo capsular: la septicemia hemorrágica es generalmente causada por los grupos B y E, y afecta a los bovinos y los búfalos; el cólera aviar es causado por los serogrupos A y F, ocasionalmente el D; la rinitis atrófica en cerdos se desarrolla por cepas productoras de toxinas, usualmente del grupo D; la infección del tracto respiratorio se relaciona al serogrupo A (Martínez Razo, 2013).

El principal polisacárido componente del serotipo A es el ácido hialurónico que es sensible a la acción de la hialuronidasa. El aparente predominio de las cepas del serotipo A en infecciones en humanos se ha atribuido a las propiedades antifagocíticas de los componentes del ácido hialurónico capsular que impiden la acción fagocítica y promueve la colonización de la mucosa del tracto respiratorio inferior en humanos. Las cápsulas del serotipo D están compuestas de heparina o sulfato de heparina y las cápsulas del serotipo F están compuestas de condroitina, estos fueron identificados por la acción de las mucopolisacaridasas que provocan su descapsulación. Los aislamientos clínicos en humanos con cápsulas de serotipo D se asocian con mayor frecuencia con infecciones sistémicas resultantes de la exposición de la piel y los tejidos blandos (Wilson & Ho, 2013; Martínez Razo, 2013).

Los genes involucrados en la biosíntesis de diferentes tipos de cápsulas de *P. multocida* están ubicados dentro de un solo locus en el genoma. El análisis de la organización genética de los loci de la cápsula A, B, D y F reveló tres grupos de genes funcionales separados: un grupo para la biosíntesis de la cápsula, un grupo responsable de la sustitución de fosfolípidos y un grupo para la exportación de la cápsula. Se han determinado al menos dos tipos de organizaciones genéticas para los loci del casquete en *P. multocida*. El tipo I, característicos de las cepas de *P. multocida* tipo A, D y F, consisten en 10 genes, *phyBA-hyaEDCB-hexDCBA*, donde *phyBA* funciona en la sustitución de fosfolípidos, *hyaEDCB* funciona en la biosíntesis de la cápsula y *hexDCBA* funciona en la exportación de la cápsula (Peng *et al*, 2019). Otro factor de virulencia conocido de *P. multocida* serotipo A y D, es la toxina llamada PMT, que es un miembro de la familia de toxinas dermonecróticas de G- toxinas desamidantes de proteínas. La PMT ingresa a las células de los mamíferos y ejerce su efecto en las células a través de la modulación de múltiples vías de señalización.

Posee actividad citotóxica en células de pulmón de embriones, produce atrofia esplénica, diarrea mucoide y muerte en ratones; daño endotelial vascular en hígado de cerdos y ratas; atrofia en los huesos turbinados en diversas especies como cerdos, ratas, conejos y cabras. Está codificado por el gen *toxA* de 3,858 pb, que se encuentra en un profago intacto predicho de 56.030 pb adyacente a un gen de ARNt (tRNA^{Trp}) en la cepa toxigénica HN06 de *P. multocida* aislada de un caso de rinitis atrófica progresiva en cerdos (Peng *et al*, 2019; Martínez Razo, 2013; Soto Ruiz, 2012).

2.4 Signología y lesiones

P. multocida coloniza la nasofaringe, el tracto respiratorio y gastrointestinal y otros órganos de varios animales y en condiciones de estrés induce signos de enfermedad desde leves como los estornudos, secreciones mucosas abundantes, rinitis, neumonía con respiración dificultosa y fiebre; sin embargo, puede progresar y manifestarse como enfermedad diseminada ya sea como septicemia hemorrágica y/o rinitis atrófica, produciendo lesiones bronconeumónicas de características fibrinosupurativas y necrotizantes por la intensa respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos, macrófagos alveolares, células epiteliales alveolares y bronquiales, el endotelio vascular y linfocitos que provocan una respuesta aguda dañando el parénquima pulmonar lo que ocasiona apoptosis y muerte celular (Mostaan *et al*, 2020; García Álvarez, 2018).

2.5 Diagnóstico

El diagnóstico de pasteurelosis en hatos caprinos se basa principalmente en la historia y el examen clínico del rebaño. Entre los signos de bronconeumonía aguda que se deben tomar en cuenta son disnea, fiebre, depresión, anorexia, tos, secreción oronasal y sonidos pulmonares anormales. La auscultación pulmonar está poco relacionada con la distribución de lesiones pulmonares, el leucograma sanguíneo, la concentración de fibrinógeno y la concentración de proteína pueden indicar reacción inflamatoria inespecífica.

Para llegar al diagnóstico definitivo se deben tomar muestras *ante mortem* como exudados nasofaríngeos e incluso lavados broncoalveolares. Durante la necropsia también se pueden tomar estos lavados y mandar pulmones con lesiones al laboratorio para poder realizar los estudios bacteriológicos y hacer pruebas de PCR (Díaz Aparacio *et al*, 2015; Still Brooks, 2022).

2.6 Vacunación

La pasteurelisis es una enfermedad altamente contagiosa y compleja que afecta a casi todas las especies animales. Las medidas de control actuales son costosas y de eficacia limitada, por lo tanto, las estrategias de diseño de vacunas conducen a ofrecer protección cruzada como el mejor método de control eficaz. Estas contemplan a las bacterinas, que son bacterias inactivadas mediante el calor o agentes químicos para provocar lisis celular; las vacunas vivas atenuadas se basan en bacterias que han crecido en ambientes deficientes de hierro o se les ha suprimido genes de virulencia; las vacunas acelulares las cuales trabajan con una o varias fracciones patógenas de la bacteria como lipopolisacárido (LPS), toxina de *P. multocida* (PMT), toxina dermonecrótica (DNT), proteínas de la membrana externa nativas y reguladas por hierro o modificadas térmicamente, adhesinas bacterianas, entre otras; las vacunas recombinantes, cumplen con la función de combatir la enfermedad además de generar inmunidad de manera similar a las vacunas acelulares; y las vacunas genéticas o de ADN provocan inmunidad al transfectar células huésped que codifican ADN con un antígeno, en lugar de inyectar antígenos proteicos o peptídicos (Mostaan, *et al*, 2020; Yassein *et al*, 2021)

Algunas vacunas elaboradas con bacterias inactivadas y/o toxinas están disponibles comercialmente. Una vacuna comercial (CholeramuneM, Multimunem o M-Ninevax-C) contra el cólera aviar (pollos y pavos), se basa en una preparación liofilizada de un aislamiento aviar vivo, avirulento, de la cepa M-9 de *P. multocida* (Un cruce del serotipo A:3-A:4). Una vacuna combinada trivalente (Landavax) contra el cólera aviar (para patos, pollos y otras aves) y la pasteurelisis del conejo, está disponible como una emulsión de aceite de bacterina inactivada de las cepas de *P. multocida* serotipo A:1, A:3 y A:4 (Mostaan *et al*, 2020). Para el caso de rumiantes y pequeños rumiantes, se encuentra una bacterina-toxoide, Bobact 8, incluye células inactivadas de *P. multocida* (MSD Salud Animal, 2025).

2.7 Epidemiología

Diferentes cepas de *P. multocida* son considerados como los agentes primarios de diferentes enfermedades ya que es capaz de infectar gran variedad de mamíferos, reptiles y hasta humanos. Es el agente primario para cólera aviar en aves silvestres de Norteamérica, provocando brotes significativos con regularidad entre productores asentados en zonas donde las aves acuáticas se congregan en temporada de

migración, siendo los más afectados los pavos. En caso de los cerdos, la enfermedad que causa es rinitis atrófica, afectando la industria porcina ya que reduce la ganancia de peso de los individuos entre 6 y 10%. En bovinos, la septicemia hemorrágica que se presenta suele ser fatal una vez que se presentan signos, aunque las pérdidas anuales declaradas varían mucho de un país a otro, en algunos países se estiman pérdidas económicas de hasta 350 millones de dólares en algunos países. En el caso de cabras, ocasionan brotes septicémicos y/o neumónicos que pueden derivar en la muerte sobre todo de cabritos lactantes, quienes son los más susceptibles (Boyce *et al*, 2010; Peng *et al*, 2019; Martínez Razo *et al*, 2023).

3. OBJETIVO

3.1 General

Determinar la presencia de *Pasteurella multocida* serotipo D., en muestras de caprinos con signos de neumonía.

3.2 Específicos

- Aislar *Pasteurella multocida* a partir de hisopados nasales obtenidos de cabras
- Identificar *Pasteurella multocida* por medio de pruebas bioquímicas para determinar género y especie de aislamientos sospechosos
- Determinar el grupo capsular de *Pasteurella multocida* por medio de técnicas convencionales y moleculares.

4. METODOLOGÍA

4.1 Sitio de muestreo

Los muestreos se realizaron en rebaños de caprinos en el periodo comprendido entre febrero y junio de 2023, en zonas de producción ubicados en los pueblos de San Juan Cruz y Naranjillo, en el municipio de Juventino Rosas, Guanajuato; en la explotación caprina del CEIPSA de la FMVZ-UNAM ubicado en Topilejo, Tlalpan, CDMX; y en los pueblos de Santa Catarina Ayotzingo y las Colonias, en Chalco de Díaz Covarrubias, Estado de México. También se trabajaron con 76 cepas aisladas resguardadas en el CENID-SAI sede Palo Alto y cinco de la FES-C Campus 4. (Tabla 1 y Figura 1).

Fecha	No. de muestras	Procedencia
16 de febrero de 2023	5	San Juan Cruz y Naranjillo, Guanajuato
9 de marzo de 2023	2	San Juan Cruz, Guanajuato
15 de marzo de 2023	7	Cerrito, San Juan Cruz, Guanajuato
30 de marzo de 2023	3	San Juan Cruz, Guanajuato
12 de abril de 2023	34	CEIPSA, Tlalpan, CDMX
18 de mayo de 2023	76	CENID-SAI Palo Alto
24 de mayo de 2023	12	Las Colonias, Chalco, Estado de México
25 de mayo de 2023	9	Santa Catarina Ayotzingo, Chalco, Estado de México
12 de junio de 2023	5	FES-C
26 de junio de 2023	3	Naranjillo, Guanajuato

Tabla 1. Fechas de muestreo, cantidad de muestras y procedencia

4.2 Muestreo

Se colectaron muestras de exudados nasales de animales con problemas respiratorios y con signos de secreción nasal y ocular, tos, estertores a la auscultación torácica, depresión y/o fiebre. Estas se colectaron en un medio de transporte Ames con carbón activado y se mantuvieron en refrigeración a 4°C para ser enviados al laboratorio.



Figura 1. En la imagen de la izquierda se observan instalaciones de CEIPSA donde se tomaron muestras, en la de en medio se observa la toma de muestras por un hisopado nasal y en foto de la derecha se muestran a las cabras de un rebaño en Chalco

4.3 Análisis de muestras

El análisis y el procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de los Pequeños Rumiantes del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Salud Animal e Inocuidad, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias ubicado en la CDMX.

4.3.1 Aislamiento de *P. multocida*

El aislamiento e identificación de colonias sugerentes a *Pasteurella multocida* se realizó en agar sangre al 5% a partir del hisopo nasal, se realizó la siembra por medio de estría cruzada y se incubaron por 24 horas a 37°C. Una vez concluido el tiempo, las colonias sugerentes a *Pasteurella multocida* se seleccionaron (Figura 2) y se realizó tinción de Gram para ser observadas al microscopio y determinar la morfología de cocobacilos Gram (-). Se realizaron resiembras de estas colonias que cumplieron con morfología celular para conseguir aislamientos puros.



Fig. 2. Agar sangre sembrado con aislamientos de *P. multocida*, las colonias se observan lisas, de aspecto mucoide, de color blanco grisáceo.

4.3.2 Identificación de *P. multocida* por pruebas bioquímicas

A los aislamientos sospechosos se les realizó las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y SIM descritas por Figueroa Ochoa *et al*, 2014. Para la primera se utilizó una solución de Peróxido de Hidrógeno al 3% y se colocó una gota (20 µL) en un portaobjetos y con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una colonia aislada y se colocó sobre la gota, se consideró catalasa positiva si se observaba la formación inmediata de una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas, como se observa en la Figura 3.



Figura 3. Prueba de catalasa, donde en el portaobjetos se observa formación de burbujas indicador que la enzima catalasa está reaccionando con el agua oxigenada

Para la prueba de oxidasa se utilizó un reactivo comercial Hach®, una solución acuosa al 1 % de N,N,N,N tetrametil-p-fenilendiamina dihidrocloruro (Figura 4). Se colocó una gota del reactivo sobre papel filtro y con un asa bacteriológica se tomó una colonia aislada y se depositó en el centro de la gota. Se consideró positiva si se teñía de color azul dentro del rango de 1 minuto.



Figura. 4. Las flechas indican pruebas positivas a oxidasa. Al colocar una colonia sobre el reactivo, este tiñe de azul debido a la reacción del citocromo evidenciando la presencia de oxidasas

La prueba de producción de ácido sulfhídrico (H₂S), indol y motilidad se realizó con medio SIM. Para ello se tomó una colonia aislada con ayuda de un asa bacteriológica recta y se inoculó con una picadura hasta el fondo del medio. Se dejó incubar durante 24 horas a 37°C. Al no haber precipitado negro ni turbidez se consideró negativo a H₂S y a motilidad. Para observar si hay producción de indol se añadieron 5 gotas de reactivo de Kovac's (p-dimetilaminobenzaldehído) (Figura 5).

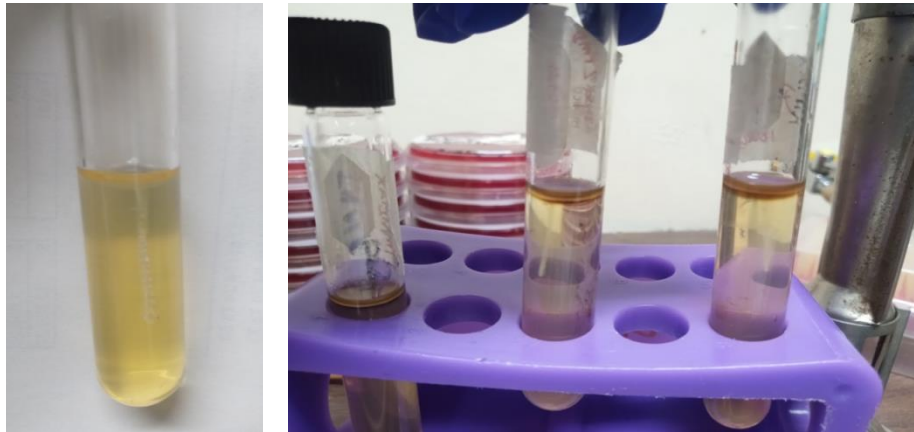


Figura 5. *Pasteurella spp*, inoculada en distintas bioquímicas para la identificación del género. Prueba SIM a las 24 horas a partir de cultivo puro, en la imagen de la izquierda no se observa precipitado ni turbidez, indicando que no hay producción de ácido sulfhídrico ni motilidad bacterianas. En la imagen de la derecha, una vez agregado el reactivo de Kovac, se forma un precipitado rojo, indicando la producción de indol.

Para la identificación capsular se realizó la prueba de hialuronidasa descrita por Campuzano (2011). Se sembraron las colonias sospechosas de ser *P. multocida* en estría cerrada en toda la caja y se cruzó una estría de *S. aureus*, se incubó por 24 horas a 37°C (Figura 6)

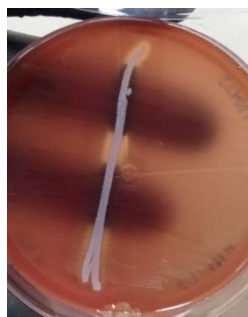


Figura 6. Prueba de hialuronidasa para identificar el serotipo A de *Pasteurella multocida*. Se siembra en toda la placa de agar sangre y por la mitad se hace una estría con una cepa de *Staphylococcus aureus*, que secreta la hialuronidasa, la cual destruye la cápsula de *P. multocida*, que está compuesta por ácido hialurónico

4.3.3 Aislamiento e identificación de *P. multocida* mediante técnicas moleculares

4.3.3.1 Extracción de ADN

Para la extracción de material genético de aislamientos bacterianos de no más de 24 horas de crecimiento, se utilizó la técnica de Fenol-Cloroformo modificado de Red Nacional de Biobancos tomando una asada de cultivo de no más de 24 horas de crecimiento y se homogeneizó en 1 ml de solución salina estéril. Se agregó 50 µL de buffer de lisis, 10 µL de lisozima y 50 µL de SDS 10% y se incubó a 37°C durante 10 min, posteriormente se dejó en baño María a 100°C por 30 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 2 volúmenes de fenol-cloroformo y se centrifugó a 13,000 RPM por 5 minutos. La capa acuosa superior formada se transfirió a un nuevo tubo. Para precipitar el ADN se añadió 1 volumen de isopropanol frío y se centrifugó durante 10 min a 13,000 RPM, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 50 µL de agua destilada estéril precalentada a 50°C.

4.3.3.2 Cuantificación

La calidad de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), a 70 Volts por 15 minutos; además se cuantificó con un Nanodrop *Nano-100 Micro-Spectrophotometer 2.0* para obtener la cantidad (ng/µL) y la calidad del ADN extraído, considerando para esta última la absorbancia a 260 nm /280 nm, con una proporción de 1.8 para ser aceptada como ADN puro (Velázquez *et al.*, 2012).

4.3.3.3 Técnica PCR

Se estandarizó una PCR punto final para *P. multocida*, teniendo como objetivo tres genes (Tabla 2). Para género y especie se identificó la secuencia KMT para el biotipo de las cepas ya que es un gen altamente conservado que codifica proteínas para la pared celular exclusiva de *P. multocida*, para el serotipo capsular de las cepas fue determinado utilizando la detección de los genes *hyaD-hyaC* para el serotipo A que codifican glucosiltransferasa del ácido hialurónico de *P. multocida* sintasa y el gen *dcbF* para el serotipo D que codifica coindritín sintasa para la formación de la cápsulas (Guan *et al.*, 2019; Nefedchenko *et al.*, 2017).

Biotipo	Gen	Secuencia (Sentido/contrasentido)	Tamaño del producto (pb)
Género y especie	KMT1	5'-ATCCGCTATTTACCCAGTGG-3' 5'-GCTGTAAACGAACCTCGCCAC-3'	460
A	<i>hyaD-hyaC</i>	5'-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3' 5'-TTGCCATCATTGTCAGTG-3'	1044
D	<i>dcbF</i>	5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' 5'-CATCTACCCACTCAACCATATCAG-3'	657

Tabla 2. Secuencia de iniciadores de serotipos capsulares de *P. multocida*, utilizados en este estudio

4.3.3.4 Condiciones de la PCR

La reacción se realizó en un volumen final de 25 μ L, que contenía 6.25 μ L de AmpliTaq Gold TM Fast PCR Master Mix, 2.5 μ L de los cebadores a una concentración de 10 μ M, 5 μ L de ADN extraído y agua grado molecular. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Multigene Optimax Labnet (Figura 7) en las condiciones reportadas por Martínez Razo en 2013 las cuales fueron:

- Desnaturalización inicial: 95°C x 5 min x 1 ciclo
- Desnaturalización: 95°C x 30 seg x 30 ciclos
- Alineación: 56.5°C x 30 seg x 30 ciclos
- Extensión: 72°C x 30 seg x 30 ciclos
- Extensión final: 72°C x 5 min x 1 ciclo

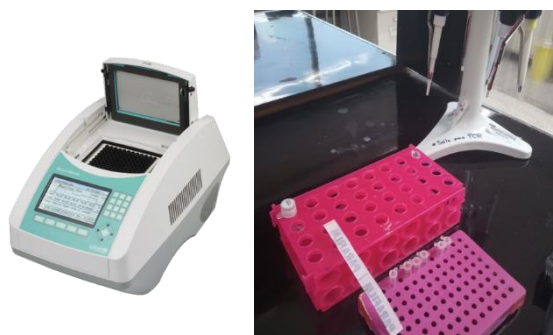


Figura 7. Material y equipos utilizados en la PCR punto final

4.3.3.5 Visualización del producto amplificado

Se realizó electroforesis por 30 min y se visualizaron los productos de las reacciones (Figura 8). Se preparó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), para visualizar las bandas se utilizó un fotodocumentador. El producto de amplificación fue de 460 pb (Figura 9)

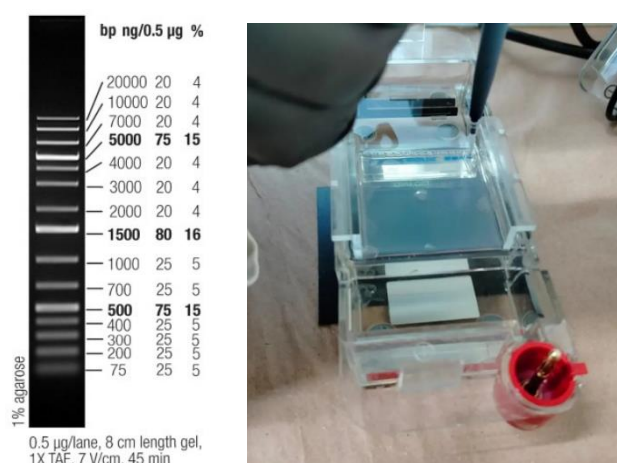


Figura 8. A la derecha se encuentra el valor correspondiente del marcador de pares de bases utilizado para la técnica de PCR. En la imagen izquierda, se observa cómo se colocan los productos de PCR con bromuro de etidio en el gel de agarosa al 1% para realizar electroforesis y visualizar las bandas de los productos obtenidos

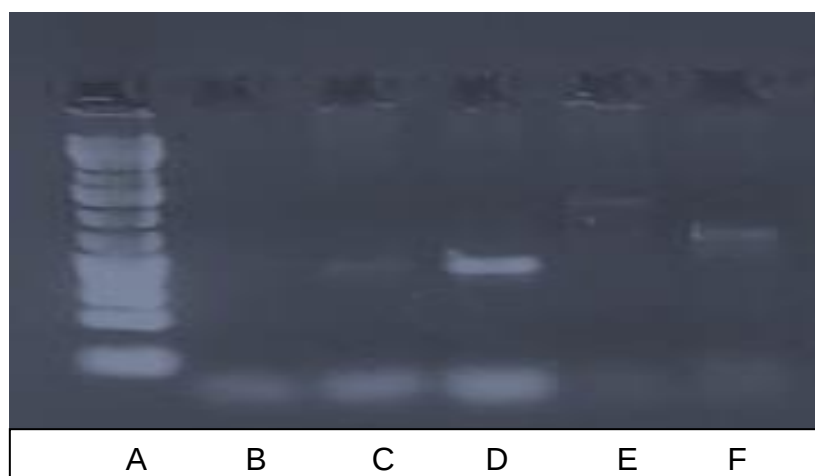


Figura 9. Foto de PCR de estandarización de las cepas control para cada uno de los primers. En la columna A se colocó el marcador de pares de bases 1 kb. En la columna B se colocó el control negativo. En la columna C y D se colocaron ambas cepas de Pm donde se observa amplicones entre los valores de 400 y 500, confirmando el género y especie. En columna E, se observa amplicón entre 1000 y 1500, corroborando el serotipo Pm A y en la columna F, el amplicón está entre 500 y 700, se verifica que la cepa es Pm D.

5. RESULTADOS

Se trabajaron en total con 156 muestras, de las cuales 76 fueron aislamientos resguardados en el CENID-SAI Palo Alto que ya se habían identificado como *P. multocida* y cinco aislamientos procedentes de FES-C.

De las muestras provenientes del estado de Guanajuato presentaron diferentes morfologías coloniales, en su mayoría colonias redondeadas y otras onduladas, de color blanco, grisáceo y amarillento, de tamaños variados desde menores a 1 mm (puntiformes) hasta los 5 mm, algunos presentaron consistencia mucosa y brillante de bordes bien definidos; mientras que otras se observaron secas; con elevaciones convexas en su mayoría, pero también había planas y planoconvexas. Los bordes observados eran ondulados (Figura 10). Muchas colonias presentaron hemólisis completa y otras en forma parcial, muy pocas se observaron sin hemólisis. Al realizar la tinción de Gram se observaron bacterias Gram positivas y negativas. La morfología más común entre las primeras fueron bacilos alargados, diplococos y estreptococos; mientras que para las segundas se observaron diplococos, cocobacilos y bacilos cortos. Se seleccionaron para hacer resiembras las colonias donde se observaron cocobacilos Gram negativos con el fin de lograr aislamientos puros; sin embargo, no se logró una separación de colonias adecuada.

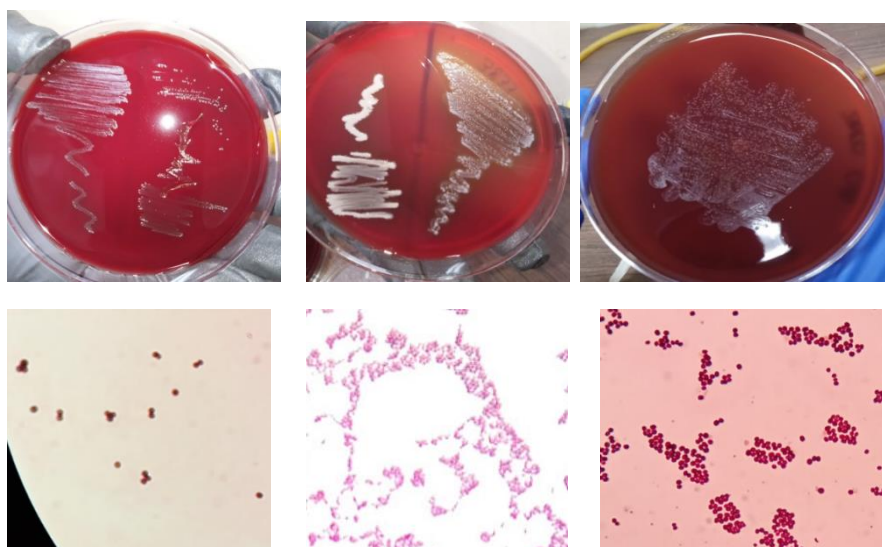


Figura 10. Crecimientos bacterianos de las muestras provenientes de Guanajuato después de 24 horas de incubación. En las fotos superiores, se observan colonias que no son compatibles con *P. multocida*. En las fotos de abajo se observan cocos agrupados entre Gram positivos y Gram negativos

Los aislamientos bacterianos de los hisopados nasales de CEIPSA mostraron una morfología colonial y bacteriana sugerente a *P. multocida* ya que al microscopio se observaron cocobacilos Gram negativos (Figura 11). Sólo cinco de ellas se seleccionaron para continuar con los procedimientos.

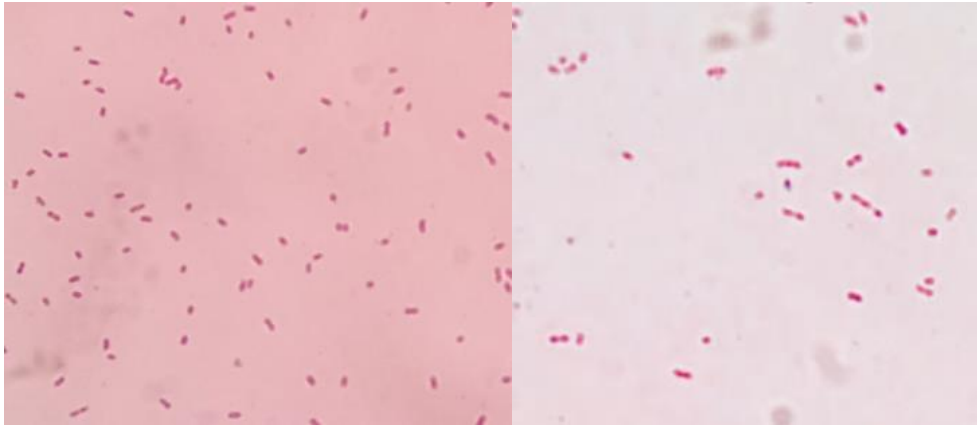


Figura 11. Crecimientos bacterianos de las muestras provenientes de CEIPSA, donde se observan cocobacilos Gram negativos, sugerentes a *P. multocida*.

Los aislamientos seleccionados se sometieron a las pruebas de catalasa y oxidasa, siendo positivos a ambos (Figura 12), en medio SIM no mostraron formación de ácido sulfhídrico ni turbidez. A prueba de hialuronidasa cuatro fueron positivas. Se realizó PCR para género de *P. multocida* y serotipo D, siendo negativas.



Figura 12. En foto de la izquierda se observa el crecimiento de cepas de *P. multocida*, a la derecha las pruebas positivas a catalasa y oxidasa.

Las resiembras de las cepas resguardadas en el CENID-SAI de Palo Alto, mostraron crecimientos con colonias mucoides, pero todas en su mayoría presentaron hemolisis y al microscopio había bacterias tanto Gram positivas y negativas.

Las muestras obtenidas de los rebaños del municipio de Chalco mostraron colonias sugerentes a *P. multocida*, aunque varios crecimientos presentaron hemolisis y al microscopio se observaron cocobacilos, bacilos y diplococos Gram negativos. Se aislaron las colonias de tres cajas que cumplieron con morfología celular para resiembras y tener aislamientos puros. Dieron positivo a catalasa y oxidasa, en medio SIM negativos a ácido sulfhídrico y movilidad e indol (Figura 13).



Figura 13. Pruebas en medio SIM de cepas de muestras obtenidas en rebaños de Chalco, donde no hubo reacción con reactivo de Kovac, descartando la presencia de *P. multocida*

A la tinción de Gram, los aislamientos de FES-C mostraron morfología correspondiente a *P. multocida*, aunque se observó en algunas colonias hemolisis beta. Las posteriores resiembras de estas resultaron en catalasa y oxidasa positiva, en medio SIM negativo a producción de H₂S y movilidad, positivo a Indol. Se realizó PCR de género y serotipo capsular D, solo una de ellas dió positiva (Figura 14). También se hizo PCR para género y especie de *M. haemolytica*, para descartar o confirmar su presencia en los aislamientos; concluyendo que la cepa aislada de *P. multocida* serotipo D estaba contaminada con *M. haemolytica*

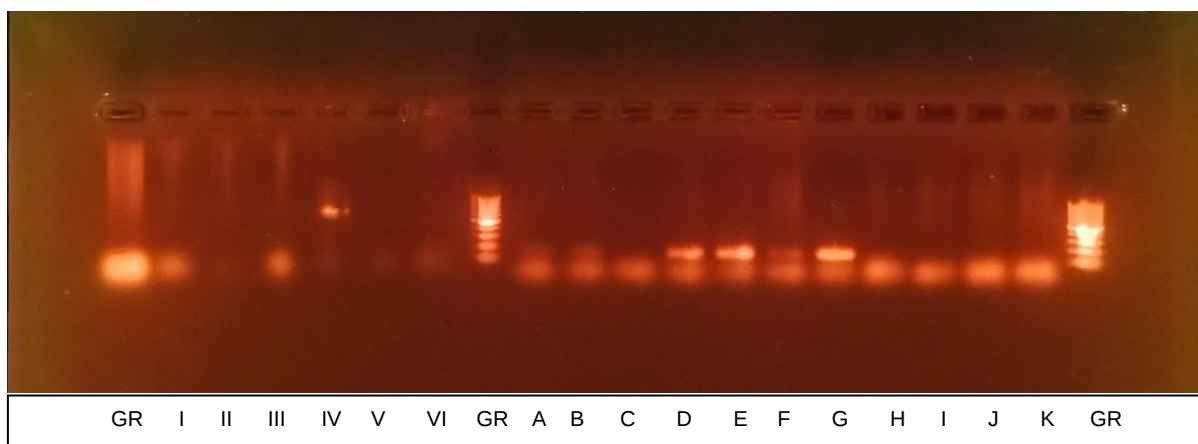


Fig. 14. Gel de Agarosa al 1% donde se observan los resultados de la PCR, carriles I-IV amplicones de las muestras de *P. multocida*; carriles de A-K, *M. haemolytica*; GR, marcador de pares de bases. En VI se colocó control de *P. multocida*, en carril V se colocó control negativo, en IV se colocó una muestra previamente identificada como *P. multocida* que corresponde al serotipo D. Del lado derecho, en A y B se colocaron los controles positivos + para *M. haemolytica*, en el C el control negativo, en D se colocó la misma muestra que en el carril IV, confirmando que en la misma muestra también hay *M. haemolytica*.

Se repitió el ensayo con los mismos controles, para revisar que no hubiese sido un error al momento realizar la PCR, obteniendo que no amplificó para el control positivo de *P. multocida* serotipo D (Figura 15).

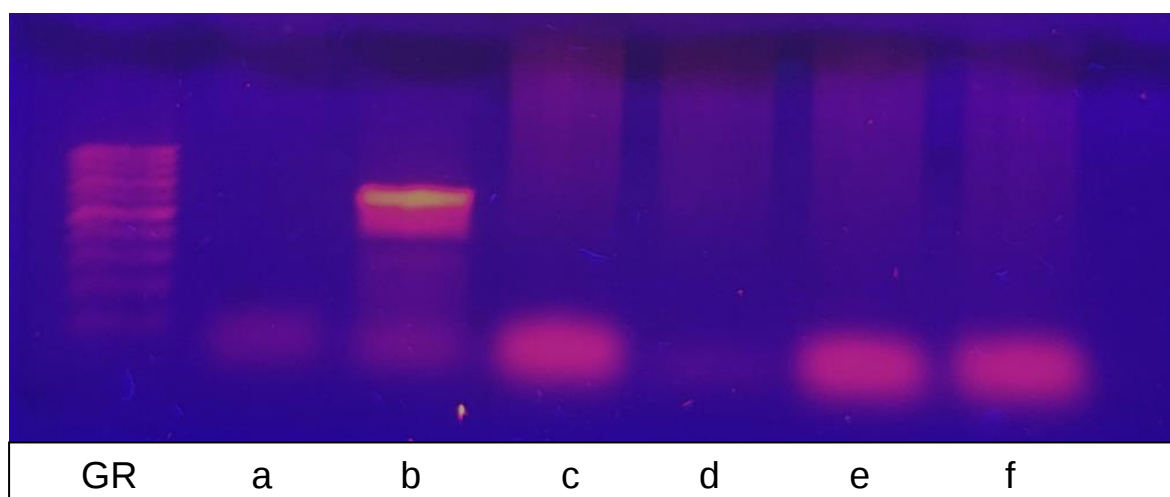


Figura 15. Gel de agarosa 1%. Carril a, control positivo, carril f control negativo. En carril b muestra sospechosa amplificó una banda de 657 pb, que corresponde al gen dcbF, identificando esta muestra como *P. multocida* serotipo D.

6. DISCUSIÓN

Uno de los principales retos a los que se enfrentó fue la temporada estacional en la que se realizó el estudio y la toma de muestras, actividades que se realizaron entre los meses de marzo a junio del año 2023; ya que se ha descrito que la enfermedad por complejo respiratorio se manifiesta en momentos donde las condiciones ambientales suelen ser adversas y existen cambios bruscos de temperatura y corrientes de aire (Palomares Resendiz *et al*, 2021). En el estudio realizado por Muheet *et al*, entre 2017 y 2019 en el que se observaron 180 cabras, arrojaron como resultados un incremento de enfermedades respiratorias en un 8% en el invierno, mientras que en primavera solo fue del 5%. De estas enfermedades, se identificó entre un 13 y 15 % correspondientes a infecciones por *Pasteurella*. Por lo anterior, uno de los factores que influyó bastante para el aislamiento de *P. multocida* serotipo D, fueron las condiciones climáticas, ya que los muestreos se realizaron durante la primavera por lo que disminuyó el número de casos con enfermedad respiratoria, siendo además que los municipios de Guanajuato presentan un clima mucho más cálido y seco, comparado con otras regiones que presentan un clima cálido con humedad ambiental, lo que incrementa la prevalencia de enfermedades respiratorias (Abdullah Jesse *et al*, 2019).

Sumado a lo anterior, de acuerdo a los resultados del estudio publicado por Martínez Razo y col en 2023, de un total de 1,498 muestras de hisopado nasal, sólo se obtuvieron 535 aislamientos de bacterias que pertenecen a la familia *Pasteurellaceae*, de los cuales 491 correspondieron a *M. haemolytica* y 44 correspondieron a *P. multocida*. De esas 44, sólo 8 aislamientos correspondieron al serotipo D, que es de nuestro interés. Lo anterior implica que, con la cantidad de muestras obtenidas para este trabajo en una estacionalidad poco favorable, la posibilidad de aislar *Pasteurella multocida* serotipo D era muy baja, sumado a que es más común aislar *M. haemolytica*. Esta situación es similar en otros estudios reportados como el de Girma, y col. en 2023, en el que se tomaron en cuenta 450 cabras y ovejas en la región de Borana, Etiopía, de las cuales sólo 52 presentaban signos clínicos de neumonía, se tomaron hisopados nasales para cultivo, encontrando 13 muestras positivas a *M. haemolytica*. En el mismo estudio, en la región de Arsi, Etiopía, de una población de 301 cabras y borregos, sólo 78 presentaron signos de neumonía, mismas a las que se les tomaron hisopados nasales, de ellas sólo se indentificaron 14 como *M. haemolytica*, y negativas a *P. multocida*.

En el estudio realizado por Boumart y col., en 2021, obtuvieron tejido pulmonar de 55 animales con lesiones compatibles con neumonía: 37 bovinos, 10 ovinos y 8 caprinos. Es de llamar la atención que *P. multocida* fue aislada en 7 de 8 muestras provenientes de cabras, mientras que de los 10 borregos, 5 fueron positivas a *P. multocida*. El serotipo de estas fue A y no D; sin embargo, el hecho de encontrar *P. multocida* en cultivos directos de tejido pulmonar, nos brinda la idea de tomar otro tipo de muestra. Uno de los principales desafíos fue lograr la identificación de colonias con la morfología correspondiente de *P. multocida*, ya que al realizar los primo aislamientos se encontró con la dificultad de distinguir las colonias de interés. Esto se pudo deber a las técnicas de sembrado, ya que con las primeras muestras se utilizó la técnica de sembrado por estría cerrada, lo que no permite la identificación adecuada de las colonias de interés ya que los crecimientos se sobreponían y no permitieron observar características importantes para la identificación como la ausencia de hemólisis. Esta situación mejoró cuando se realizó la siembra por medio de la técnica de estría cruzada, ya que permitió ir separando colonias con las características descritas para *P. multocida* (Aguilar Romero et al, 2013; Figueroa Ochoa et al, 2014).

Sin embargo, el principal reto fue poder separar las colonias de *P. multocida* de *M. haemolytica*, ya que ambas pertenecen a la misma familia, comparten características de colonia similar como lo reportado por Figueroa y col. en 2014: colonias mucoides, lisas, húmedas, color de blanco a grisáceo y con un diámetro de 2-3 mm. Además que a nivel microscópico la morfología celular es similar, por lo que se recurren a pruebas para caracterizarlas e identificarlas con el fin de realizar aislamientos puros. Tradicionalmente la caracterización de *P. multocida* se realiza por medio de pruebas primarias y secundarias de identificación. Entre las pruebas que se realizan son catalasa, oxidasa, citrato, TSI, Urea, SIM, y pruebas de aprovechamiento de carbohidratos. La única diferencia entre *P. multocida* y *M. haemolytica* es en la prueba de SIM, donde la primera es indol positiva mientras que la segunda es negativa, lectura que se hace a las 24 horas de incubación; siendo esta la única prueba bioquímica que nos diferencia los cultivos de estas bacterias que son de la misma familia y que se utilizó en este estudio (Figueroa Ochoa et al, 2014). Los estudios realizados por Villegas Vazquez y col. en 2014 realizado en bovinos; el de Lugo Marante y col. en 2019 donde se trabajaron con muestras de conejos; y el de Malik y col en 2023 en el que se trabajaron con muestras de una colección, la identificación bacteriana se llevó a cabo por los sistemas API-20 NE BioMérieux,

Francia; que es una batería de pruebas bioquímicas estandarizada para bacterias Gram negativas, que permite la identificación de *P. multocida* con gran precisión teniendo lecturas a la 24 horas una vez realizadas, lo que supone una ventaja sobre las pruebas bioquímicas tradicionales ya que algunas de estas se leen a las 18 horas de incubación y otras hasta las 48 horas para evitar errores de interpretación. Sin embargo, como principal desventaja es el costo del software, ya que suele ser alto y sin él, no se puede realizar la interpretación de las pruebas.

Para la identificación de los aislamientos logrados se utilizó PCR punto final, identificando *P. multocida* serotipo D a partir de los genes KMT, para género y especie; *hyaD-hyaC* para el serotipo A; y *dcbF*, para el serotipo D. Esta técnica de identificación genotípica ha mostrado resultados confiables sobre todo cuando se le compara con técnicas de identificación fenotípicas para identificar serotipos como la prueba de hialuronidasa y acriflavina. El estudio realizado por Figueiredo Amaral y col. en 2016, se utilizaron 44 aislamientos de *P. multocida*, obtenidas en casos de neumonías en cerdos, identificando 40 aislamientos como serotipo A, 2 como serotipo D y dos no se lograron tipificar; sin embargo, al hacer la identificación mediante PCR, los resultados cambiaron a 38 aislamientos como serotipo A y los 6 restantes como serotipo D. Caso similar al estudio realizado por Malik y col. en el 2023, en el que se trabajaron con 82 aislamientos de una colección previamente identificadas de los serotipos A, B y D, al que se sometieron a pruebas de identificación fenotípicas, teniendo como resultados 34 del serotipo A, 9 del serotipo D, 16 del serotipo B y las restantes no se identificaron; mientras que al realizar la identificación por PCR se tipificaron 59 como serotipo A, 4 como serotipo D, 16 como B, 1 como serotipo F y 2 que no se identificó grupo capsular. Es importante mencionar que las cápsulas de los serotipos A y D se componen de glicosaminoglicanos, que es un heteropolisacárido de dos unidades: hexosamina y un ácido glucurónico y que solo varían en la posición del enlace, lo que puede explicar que ante ciertas reacciones presente un comportamiento similar y por tanto se puedan tomar cepas de serotipo A como serotipo D ante la prueba de acriflavina.

Figueiredo y col. en 2016 también describe que algunos aislamientos de serotipo D pueden verse disminuidos ante el crecimiento de *S. aureus*, lo que podría indicar que algunas cepas de serotipo D puedan poseer ácido hialurónico periférico que se reduce ante la presencia de hialuronidasa, lo que se puede interpretar como un falso positivo para *P. multocida* serotipo A. También es importante mencionar la correlación que

obtuvieron de ambos métodos fue del 90.9% con un coeficiente kappa ponderado de 0.633, lo que indica una buena concordancia entre los resultados de ambas pruebas. Lo anterior nos habla de la sensibilidad y especificidad que tienen las pruebas genotípicas sobre las fenotípicas, por lo que se puede decir que la PCR como método de diagnóstico para identificar ya no solo género y especie, sino también el serotipo capsular es una de las mejores opciones.

7. CONCLUSIÓN

P. multocida es una bacteria que, a pesar de haber sido descubierta desde fines del siglo XIX por Louis Pasteur, sigue siendo de vital interés por el gran espectro de especies animales en los que se puede hospedar y los daños que esta puede representar si se genera un brote. En el caso particular de los caprinos, de los cuales se obtienen una gran variedad de productos y subproductos; es de importancia entender los factores que puedan favorecer su crecimiento, ya que forma parte de la microbiota normal del tracto respiratorio alto lo que complica establecer estrategias de control y prevención efectivas. Parte de ello consiste en realizar aislamientos de los individuos que presenten enfermedades respiratorias activas en temporadas de estrés ambiental.

Si bien, de acuerdo a diferentes estudios la prevalencia de *P. multocida* serotipo A es mayor al serotipo D, y al hecho que durante este estudio no se haya aislado esta última en muestras de campo; existen reportes previos de su identificación en diferentes hatos caprinos identificados también mediante la técnica PCR, por lo que se puede decir que es una de las bacterias importantes que forman parte del Complejo Respiratorio Infeccioso de los Rumiantes.

La importancia de identificar el serotipo capsular radica en ser uno de los principales factores que permite evadir el sistema inmunológico del hospedador por mecanismos que aún no se conocen, por lo que crear estrategias de prevención basadas en el reconocimiento de componentes de la capsula como biológicos o vacunas se hace necesario y complementario a las ya existentes.

REFERENCIAS

- Abdullah Jesse, F., Abdul Mubin, H., Umar Hambal, I., Mohd Lila, M., Teik Chung, E., Abba, Y., . . . Jefri Norsidin, M. (2019). Review on Clinical Management Involving Respiratory Diseases in Ruminants. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 321-325.
- Aguilar Romero, F., Miranda Morales, R., Alfonseca Silva, E., Mojica Sánchez, M., Cervantes Olivares, R., Morales Álvarez, J., . . . Rodríguez Reyes, A. (2013). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinaria*. CDMX: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- Andrade Montemayor, H. (2017). Producción de caprino en México. *Tierras Caprino. VIII Foro Nacional del Caprino*, 18-24.
- Barrera Perales, O., Sagarnaga Villegas, L., Salas González, J., Leos Rodríguez, J., & Santos Lavalle, R. (2018). Viabilidad económica y financiera de la ganadería caprina extensiva en San Luis Potosí, México. *Mundo agrario*, 19(40), 77.
- Barrera Perales, O., Sagarnaga Villegas, L., Salas González, J., Leos Rodríguez, J., & Santos Lavalle, R. (2018). Viabilidad económica y financiera de la ganadería caprina extensiva en San Luis Potosí, México. *Mundo Agrario. Revista de Estudios Rurales*, 19(40), e077.
- Boumart, Z., Bamouh, Z., Semmate, N., Omari Tadlaoui, K., & El Harrak, M. (2021). Biological Characterisation and Pathogenicity of a *Pasteurella multocida* Isolate from Sheep in Morocco. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 53-64.
- Boyce, J., Harper, M., Wilkie, I., & Adler, B. (2010). *Pasteurella*. En C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. Songer, & C. Thoen, *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (págs. 325-346). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Cavalloti Vázquez, B., Ramírez Valverde, B., & Cesín Vargas, J. (2019). *La ganadería ante escenarios complejos*. Chapingo, Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Chávez Espinoza, M., Cantú Silva, I., González Rodríguez, H., & Montañez Valdez, O. (2022). Sistemas de producción de pequeños rumiantes en México y su efecto en la sostenibilidad productiva. *Revista MVZ Córdoba*, 27(1).
- Díaz Aparacio, E., Tórtora Pérez, J., Palomares Reséndiz, E., & Gutiérrez Hernández, J. (2015). *Enfermedades de las cabras*. Coyoacán, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Ducoin Watty, A. (19 de Octubre de 2005). *Apuntes Zoo*. Recuperado el 15 de Febrero de 2023, de https://fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_zoo/unidad_%205_zootecnia_decaprinos.pdf
- Figueiredo Amaral, A., Rebelatto, R., Silene Klein, C., Ludwig Takeuti, K., & Santos Neves de Barcellos, D. (2016). Comparison of Phenotypic and Genotypic Identification Methods of *Pasteurella multocida* Serotypes Isolated from Pigs. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1391).

- Figuerola Ochoa, I., Mena Bañuelos, R., & Mojica Sánchez, M. (2014). *Atlas fotográfico de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinaria*. Coyoacán, Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- García Álvarez, A. (2018). *Tipificación molecular de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida asociadas a la pasteurelosis neumónica ovina (Tesis doctoral)*. Madrid: Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Girma, S., Getachew, L., Beyene, A., Tesfaye Tegegne, D., Tesgera, T., Debelo, M., . . . Sori Tolera, T. (2023). Identification of serotypes of Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida from pneumonic cases of sheep and goats and their antimicrobial sensitivity profiles in Borana and Arsi zones, Ethiopia. *Scientific Reports*, 9008(13). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-023-36026-2>
- Guan, L., Xue, Y., Ding, W., & Zhao, Z. (2019). Biosynthesis and regulation mechanisms of the Pasteurella multocida capsule. *Research in Veterinary Science*, 82-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.10.011>
- Guerrero Cruz, M. (Septiembre de 2010). La Caprinocultura en México, una estrategia de Desarrollo. *Revista Universitaria Digital de Ciencias Sociales*, 1(1), 160-171.
- Klimaa, C. Z., & McAllistera, T. (2017). Un ensayo de PCR multiplex para la serotipificación capsular molecular de los serotipos 1, 2 y 6 de Mannheimia haemolytica. *Revista de métodos microbiológicos*, 155-160.
- Lugo Marante, S., Espinosa Castaño, I., Zamora Borges, Z., Riera Ojeda, L., Sosa Testé, I., Lobo Rivero, E., & Otaño Díaz, A. (2019). Caracterización microbiológica y genotípica de cepas de Pasteurella multocida asociadas al síndrome respiratorio cunícola. *Revista de Salud Animal*.
- Malik, N., Malenkova, L., Malik, E., Guleychik, I., Chupahina, N., Rusanov, I., & Samohvalova, N. (2023). Identification of the capsule type of P. multocida strains by phenotypic methods in comparison with the multiplex PCR-method. *Agrarian science*, 54-63. doi:<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-367-2-54-63>
- Martínez Razo, I. (2013). *Distribución y Caracterización Molecular de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida en las principales regiones caprinas del país [Tesis de Maestría]*. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez Razo, I., Palomares Resendiz, E., Trigo Tavera, F., Gómez Nuñez, L., Aguilar Romero, F., & Díaz Aparicio, E. (2023). Caracterización de aislamientos de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida obtenidos de cabritos con problemas respiratorios. *ABANICO VETERINARIO*(14), 1-11.
- Mostaan, S., Ghasemzadeh, A., Sardari, S., Shokrgozar, M., Brujeni, G., Abolhassani, M., . . . Reza Asadi Karam, M. (2020). Pasteurella multocida Vaccine Candidates: A Systematic Review. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 12(3), 140-147.
- MSD Salud Animal. (2025). *BOBACT 8*. Obtenido de Categoría productos: <https://www.msd-salud-animal.mx/productos/bobact-8-inyectable/>

- Muheet, Malik, H., Parray, O., Bhat, R., & Yatoo, M. (2019). Seasonal and periodic rhythmicity of respiratory infections in small ruminants. *BIOLOGICAL RHYTHM RESEARCH*, 1-9.
- Nefedchenko, A., Shikov, A., Glotov, A., Glotova, T., Ternoyov, V., Maskyutov, R., . . . Sergeev, A. (2017). Detection and Genotyping *Pasteurella multocida* of five capsular groups in Real Time Polimerasa Chain Reaction. *Agricultural Biology*, 401-408.
- Palomares Resendiz, G., Aguilar Romero, F., Flores Pérez, C., Gómez Núñez, L., Gutiérrez Hernández, J., Herrera López, E., . . . Díaz Aparicio, E. (2021). Enfermedades infecciosas de relevancia en la producción caprina, historia, retos y perspectivas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12(3), 205-223.
- Peng, Z., Wang, X., Zhou, R., Chen, H., Wilson, B., & Wu, B. (2019). *Pasteurella multocida*: Genotypes and Genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(4).
- Rahman, M., Ahmed, E., Haque, M., Hassan, M., & Ali, M. (2022). Major respiratory diseases of goat and their epidemiology, prevention and control. *Bangladesh Journal of Livestock Research*, 1-20. doi:<https://doi.org/10.3329/bjlr.v29i1.72031>
- Ramírez Rico, G. (2018). *Estudio in vitro del efecto de lactoferrina en la secreción de proteasas de Mannheimia haemolytica A2 [Tesis de Maestría]*. Cuautitlán, Estado de México: Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán. UNAM.
- Ramos Martínez, J., Salinas González, H., Medina Elizondo, M., Figueroa Miramontes, U., & Maldonado Jáquez, J. (2020). La organización y agrupación como eje toral para el diseño de esquemas de atención a caprinocultores en el norte de México: Estudio de caso. *Abanico Veterinario*, 19.
- Ramos Martinez, J., Salinas González, H., Medina Elizondo, M., Figueroa Viramontes, U., & Maldonado Jáquez, J. (2020). La organización y agrupación como eje toral para el diseño de esquemas de atención a caprinocultores en el norte de México: Estudio de caso. *Abanico Veterinario*, 10, 1-19. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/abanico/av-2020/av201zg.pdf>
- SADER. (28 de Noviembre de 2017). *La caprinocultura en México*. Recuperado el Febrero de 2023, de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-caprinocultura-en-mexico>
- Salinas Jiménez, J. (2018). *Investigación, Gestión y Optimización de la Producción Animal para la Caprinocultura en México. (Tesis de Licenciatura)*. Ciudad de México: Facultad de Ingeniería. UNAM.
- Santos Lavallo, R. (2018). *Estrategias para incrementar la rentabilidad de la caprinocultura guanajuatense, enfocadas en mercado y calidad del queso de cabra. (Tesis de doctorado)*. Chapingo: Centro de Investigaciones económicas, sociales, y tecnológicas de la agroindustria y la agricultura mundial. Universidad Autónoma de Chapingo.
- SIAP. (2016). *INFOSIAP*. Obtenido de Resumen Nacional: http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/ResumenNacional.do

- Smith, E., Miller, E., Munoz Aguayo, J., Flores Figueroa, C., Nezworski, J., Studniski, M., . . . Johnson, T. (2021). Genomic diversity and molecular epidemiology of *Pasteurella multocida*. *PLoS ONE*, 16(4), 22.
- Soto Ruiz, E. (2012). *Susceptibilidad a antimicrobianos en cepas de Pasteurella multocida aisladas del aparato respiratorio de bovinos del Complejo Lechero de La Laguna (CLALA) y del Complejo Agropecuario e Industrial Tizayuca (CAIT), México [Tesis de Maestría]*. México : Universidad Nacional Autónoma de México.
- Still Brooks, K. (Agosto de 2022). *Manual de MSD. Manual de Veterinaria*. Recuperado el 8 de Enero de 2025, de Pasteurellosis en ovejas y cabras: <https://www.msddvetmanual.com/es/enfermedades-generalizadas/pasteurellosis-en-ovejas-y-cabras/pasteurellosis-en-ovejas-y-cabras>
- Villegas Vazquez, A., Campuzano Ocampo, V., Hernández Castro, R., Suárez Güemes, F., Trigo Tavera, F., & Jaramillo Arango, C. (2014). Caracterización de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos productores de carne clínicamente sanos en el estado de Querétaro. *Veterinaria México*, 19-28.
- Wilson, B., & Ho, M. (2013). *Pasteurella multocida: from Zoonosis to Cellular Microbiology*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 631-655.
- Yassein, A., Teleb, A., Hassan, G., & El Fiky, Z. (2021). The immune response and protective efficacy of a potential DNA vaccine against virulent *Pasteurella multocida*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(81), 1-10.