



91.
2ej

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

IDENTIFICACION DE PASTEURELLA MULTOCIDA
TIPO D EN APARATO RESPIRATORIO DE OVINOS

T E S I S

Que para obtener el Título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A

RAUL RADILLO RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:
M.V.Z. ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y METODOS	17
RESULTADOS	28
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	41

1.- INTRODUCCION.

La neumonía esta considerada como una de las enfermedades más comunes de los ovinos, por lo que se producen pérdidas económicas para la industria pecuaria, debido al retraso en el crecimiento para llegar al peso comercial, alto costo de tratamientos veterinarios, manejo y mano de obra. (27,32)

Estudios hechos en Inglaterra reportan 15% de neumonías a nivel de necropsias y 82% a nivel de diagnóstico clínico.- En Michigan, E.E.U.U. se ha reportado desde 1943 hasta 1968- un 24% como causa de mortalidad la neumonía, en Ohio, E.E.U.U. a nivel rastro se reportan el 15.9% de pulmones neumónicos.- (48).

Las enfermedades respiratorias representan un serio problema para las explotaciones de ovinos a nivel nacional ya - que en forma general tienen deficiencias de alimentación, --- condiciones sanitarias escasas y prácticamente no tienen un plan establecido de medicina preventiva, esto acarrea una serie de repercusiones como son el hacinamiento , el estrés y la baja de defensas en el tracto respiratorio. (10)

En México se ha reportado algunos artículos que hacen - referencia a la importancia de las neumonías. (33,34) Montes de Oca y col. (1985) ha publicado las principales causas de-

mortalidad en corderos neonatos en la siguiente forma: problemas neumónicos 40.3%; trastornos gastrointestinales 29%; síndrome inanición-exposición 17.6%; politraumatismos al parto 4.3%; predadores 0.7%.

En el periodo de diciembre de 1981 a enero de 1982 el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (COPEA), reporta un 20% de casos de neumonía en corderos. A nivel de rastro, Pijoan reporta 11.8% y 14.2% de animales afectados de neumonías en los años 1975 y 1976 respectivamente. (48) Estudios realizados recientemente reportan que en el Valle de Toluca el 40.2% corresponde a la mortalidad de problemas neumónicos, y en todo el Estado de México a nivel de necropsias Trigo reporta desde 12.5% hasta 40.2% de casos de neumonías (48).

En el trabajo de bacteriología y micología de pulmones-neumónicos de ovinos y caprinos publicado por Hernández y col. (1981) se lograron hacer 79 aislamientos de los siguientes microorganismos: Chromobacterium violaceum; Escherichia coli; Brahmella ovis; Staphylococcus epidermidis; Micrococcus luteus; Streptococcus spp; Aerococcus viridans; Corynebacterium ulcerans; Nocardia brasiliensis; Aspergillus orizae; Aspergillus niger; Micrococcus roseus; Basillus spp; Pasteurella multocida; Pasteurella haemolytica. Estos microorganismos se aislaron en diferente porcentaje y se mencionan en orden decreciente.

Durante los últimos cuatro años COPEA reportó que las - neumonías en cordero han fluctuado entre 19 y 37% que la mayoría de las muertes ocurren en animales de los 60 días de - edad. (33).

Como lo demuestran los datos que se mencionan en párra- fos anteriores actualmente se considera que el complejo neu- mónico de los ovinos es el más importante, por ser las enfer- medades que producen mayor mortalidad y las más altas pérdi- das económicas tanto a nivel nacional como mundial. (41)

1.1.) Tipos de neumonías

La neumonía se define como una infección de los pulmo-- nes donde se puede presentar congestión, consolidación roja- y consolidación gris, además dependiendo de la gravedad del- caso se presenta un exudado que puede ser seroso, fibrinoso, hemorrágico o purulento. (2,3,8,19). De acuerdo con la du- ración del proceso neumónico, se dividen en hiperagudas, agu- das, subagudas y crónicas; y por su extensión en locales y - difusas. (47)

Las fases sucesivas de la inflamación pulmonar no tie- nen límite entre ellas, el primer estadio se caracteriza por hiperemia activa, edema inflamatorio, capilares distendidos- con sangre en los alveolos llenos de líquido seroso. En la - segunda fase de consolidación roja las zonas afectadas pre-- sentan una consistencia semejante al hígado, y en la tercera fase presenta la misma consistencia pero con una tonalidad -

menos roja, por lo que se denomina como consolidación gris, (47).

El origen de las neumonías de los ovinos puede ser de tres tipos: físicos, químicos ó biológicos, pudiendo no existir interacción entre estos factores. (10)

1.2) Agentes Físicos .- Dentro de éste grupo lo más común es la mala técnica de sondeo, cuando se introduce la sonda por tráquea en lugar de ser introducida por esófago, también la deficiente ó excesiva ventilación durante el transporte. (47)

1.3) Agentes químicos.- Se encuentran una serie de gases irritantes como el cloro, el gas sulfuroso, vapor de éter y formol, al igual que las soluciones desparasitantes mal aplicadas. (47)

1.4.) Agentes biológicos.- Los microorganismos que han sido reconocidos como productores de neumonías son los siguientes:

a.) Virus:

- Adenovirus ovino (15, 39, 40)
- Parainfluenza 3 (PI-3) (41)
- Influenza (41)
- Maedi (18,28)
- Reovirus (3, 19, 41)
- Virus Sinsitiales Respiratorios. (13)

b.) Hongos:

- Aspergillus fumigatus. (41)
- Cryptococcus neoformans. (41)

c.) Parásitos:

- Dictyocaulus filaria. (10,29)
- Protostrongillus rufescens. (10,27,29)
- Protostrongillus brevispiculum. (10,27,29)
- Muelleris capillaris. (10,27,29)
- Linguatula serrata. (22)
- Cystocaulus ocreatus. (10)
- Neostongyillus linearis.(10)

d.) Bacterias:

- Mycoplasma arginini. (10,41)
- Mycoplasma ovipneumoniae. (10,41)
- Chlamydia psittaci. (10,27,41)
- Pasteurella multocida. (10,43)
- Pasteurella haemolytica. (10,43)
- Corynebacterium pyogenes. (10)
- Corynebacterium equi. (10)
- Haemophilus agni. (10)
- Streptococcus pneumoniae. (10,47)
- Staphylococcus aureus. (47)
- Escherichia coli. (41)
- Salmonella abortus-ovis. (41)
- Pseudomonas aeruginosa. (41)
- Haemophilus ovis. (43)
- Nocardia asteroides. (10)

1.5.) Pasteurelisis de los ovinos.

1.5.1.) Pasteurella haemolytica.

La pasteurelisis pulmonar es una de las causas más comunes de mortalidad en los ovinos. (1,25,27) Se sabe que por si solo no es capaz de producir enfermedad, esta bacteria -- causa neumonías, septicemias y mastitis en las ovejas. (9,28) También se ha reportado como causa de mortalidad en corderos. (17)

Esta bacteria juega un papel importante primario o secundario en las neumonías de bovinos, ovinos, caprinos, y -- cerdos. (8) aunque también se sabe que es un comensal común en nasofaringe de bovinos, ovinos y caprinos. (22) Los corderos adquieren el germen de la madre que es portadora de la bacteria que va a colonizar la garganta del cordero y que -- posteriormente producira mastitis a la oveja al mamar, a la vez cuando el cordero está expuesto a situaciones de estrés la Pasteurella que está en la garganta tiene la oportunidad de infectar el tejido pulmonar. (41)

Para su aislamiento esta bacteria requiere de medios -- adicionados de sangre o suero en donde produce colonias pequeñas de color gris, en agar sangre se produce hemólisis -- que se extiende poco alrededor de las colonias. Estas colonias estan formadas por bacilos o cocobacilos gramnegativos, beta-hemolíticos, indol (-) motilidad (-), MacConkey (+), -- fermenta glucosa, scarosa, arabinosa, trehalosa y la fermentación a la lactosa es variable. (6,8,22,26,36)

Se conocen dos biotipos de Pasteurella haemolytica, el biotipo A que tiene los siguientes serotipos: 1,2,5,6,7,8,9, 11,12, y el biotipo T en el que se incluyen los serotipos 3, 4 y 10 (8,9,22) El biotipo A se relaciona principalmente con neumonía en bovinos, y ovinos y septicemia en borregos lactantes. El biotipo T se relaciona principalmente con septicemias en borregos adultos. Su localización natural es la nasofaringe y las amígdalas. (8,22)

Estudios recientes indican que hay serotipos que muestran incidencia en el Valle de México, Jaramillo y col. (19-85) dicen que los serotipos más comunes son 2 (25%), 1 (15%) 5 (10%) y 11 (10%). En otro trabajo realizado por Aguilar y Jaramillo (1985) se reporta un 77% para el serotipo 1,9% para el serotipo 2 y el 14% para cepas no tipificables, siendo esta caracterización en ovinos adultos. (1)

1.5.2.) Pasteurella multocida.

Es una bacteria que para su aislamiento requiere cajas de agar sangre, en donde después de 24 horas de incubación a 37°C forma colonias de tamaño pequeño a mediano y de color gris, algunas son mucoides y presentan un olor característico. (6,8.) A partir de estas colonias al realizar la tinción de Gram se observan cocobacilos o pequeños bacilos pleomórficos gramnegativos. Para su identificación se siguen las pruebas de hemólisis (-), motilidad (-), oxidasa (-), MacConkey (-), leche tornasol (-), indol (+), fermentación de glucosa

sa (+), y sacarosa (+), la inoculación en ratón y conejo causa alta letalidad, además de utilizarse para identificación-se usa para purificación de cultivos. (8,9,14,16,26,36)

Pasteurella multocida es un microorganismo muy versátil tiene la capacidad de infectar bovinos, búfalos, borregos, -cerdos, gatos, perros y todas las aves domésticas. Conejo, -rata y ratón también llegan a ser infectados por esta bacteria. La infección en humanos se presenta particularmente por mordedura de animales infectados. Originalmente recibió varios nombres como: P. boviséptica, P. suiséptica, P. aviséptica, etc. de acuerdo con la especie de la cual fue aislada- Posteriormente en base a la bioquímica y a la fisiología de las bacterias aisladas se concluyó que a pesar de haber sido aisladas de diferentes especies animales se trato del mismo- microorganismo. (12)

El medio de Azufre-Indol-Motilidad raffinosa (S.I.M. Raffinosa) es un diseño modificado del medio original de S.I.M. en el que se añade raffinosa e indicador de Andrade con una -concentración final de agar de 0.3%. Esté medio en conjun- ción con la tinción de Gram y las pruebas de Oxidasa y Catalasa dan la identificación total del germen ya que P. multocida es la única pasteurela negativa a raffinosa y positiva a indol, además permite la diferenciación de otros bacilos -gramnegativos no móviles como Actinobacillus y Cardiobacterium por se negativo a la producción de H_2S . (37)

Los cultivos de Pasteurella multocida mueren rápidamente y las resiembras deben hacerse por lo menos dos veces al-

mes (22)

Esta bacteria forma parte de la flora bacteriana de las vías respiratorias superiores pero con frecuencia llega a causar enfermedades del aparato respiratorio en los animales -- ocasionando Cólera Aviar, Septicemia Hemorrágica, Catarro Nasal Pleuroneumónico y Neumonias. (9)

Frederiksen (reportado por Haggan y Bruner 1983) propuso 7 biotipos basados sobre la fermentación de la arabinosa, xilosa, maltosa, trehalosa, sorbitol y manitol, el biotipo 7 es incapaz de fermentar sorbitol y manitol.

Carter (reportado por Haggan y Bruner 1983) propuso - otro esquema de biotipos basados en la pruebas de decapsulación por hialuronidasa, floculación por acriflavina, iridiscencia colonial, fermentación de carbohidratos, patogenicidad para ratón y protección por suero. Los biotipos propuestos son: 1.) mucoide, 2.) septicémico-hemorrágico, 3.) porcino, 4.) canino, 5.) felino. (17). También realizó un estudio serológico clasificando los tipos por sus antígenos capsulares determinando que hay cuatro serotipos (A,B,C,D) en las - diferentes especies de animales. (22).

Para determinar los cuatro serotipos se realizó una --- prueba de hemaglutinación indirecta utilizando eritrocitos de grupo O humano como acarreador. El polisacárido (Ag. K) - sensibilizó las células, se utilizaron varios sueros anti--- Pasteurella multocida determinando cuatro tipos que fueron - designados de A a D, después un nuevo tipo E fue descrito y-

el tipo C fue descartado quedando nuevamente cuatro serogrupos (A,B,D,E). En general los tipos A y D exhiben una fuerte encapsulación y son altamente virulentos para pollos, pavos, suinos, bovinos y ratones. (12) Roberts (mencionado por Haggan y Bruner 1983) designa a estos serogrupos como I,II,III,IV - respectivamente.

Los tipos capsulares se dividen a su vez en tipos somáticos en base a las diferencias serológicas de los lipopolisacáridos (Ag. somáticos O) que da como resultado muchos serotipos. (9).

Carter (1975) reporta las enfermedades que ocasionan -- los diferentes serogrupos de la siguiente forma:

- Tipo A.- Cólera aviario y muchas otras enfermedades - en varios animales.

- Tipo B.- Septicemia hemorrágica en Asia y Europa.

- Tipo D.- Varias infecciones en muchas especies animales.

- Tipo E.- Septicemia hemorrágica en Africa Central.

A partir de los estudios realizados por Carter y Roberts (1955 y 1957) se han realizado una serie de trabajos más específicos.

Estudios recientes en México demuestran la importancia de P. multocida como causa de neumonías y consecuente mortalidad en corderos y ovinos adultos. En el trabajo reportado por Martínez y col. (1985) se hicieron aislamientos bacterianos de 102 muestras de pulmones de corderos encontrando que-

16.3% correspondian a P. multocida. (32)

Toyotsugu N y col. (1984) hicieron el aislamiento de la cepa SP-72 de P. multocida a partir de cavidad nasal de cerdos y determinaron la capacidad de producción de toxina dermonecrotica (DNT) por inoculación intradérmica en cobayos. - Otro estudio reciente sobre aislamiento de P. multocida a -- partir de conejos y cerdos determinando la serotipificación, y la presencia de DNT fue reportado por Richard y Brogden (- 1986).

P. multocida comunmente se aisla de pulmones neumónicos de cerdo y se menciona que tiene un papel en la etiología de las neumonías. sin embargo esta enfermedad no puede ser reproducida experimentalmente con el serotipo A (no toxigénico) (38)

Algunas cepas de esta bacteria producen un factor causante de eritema y necrosis en piel de cobayos y toxicidad de bazo en ratones este factor designado como toxina dermonecrotica es una proteína termolábil producida únicamente por algunas cepas de P. multocida pertenecientes al serotipo D - capsular. (35,42,49)

La DNT tiene una baja concentración de carbohidratos, - la relación proteína-carbohidratos es 48:1, está compuesta - por varios aminoácidos y no contiene ácidos nucleicos. Su peso molecular es de 112,000 daltons, el punto isoeléctrico se encuentra en 4.65 a 4.8, tiene un pH de 9.5-9.7. La cantidad de proteína capaz de causar dermonecrosis es de 1 nanogramo-

y la Dosis Letal 50% (DL₅₀) para ratón es de 0.2 microgramos. (42,49)

Para la preparación de la toxina bacteriana se requiere lisar la célula bacteriana mediante la centrifugación a --- 12,000 por gr. durante 25 min., el fluido sobrenadante se decanta y se recentrifuga a las mismas constantes. El sobrenadante final se dializa por tres días a 4⁰C con tres cambios de 6 litros de Tris NaCl buffer, posteriormente se centrifuga a las mismas constantes y se adiciona sulfato de amonio saturado al 40% obteniéndose finalmente un precipitado. (42)

La pastereiosis de los ovinos es una enfermedad contagiosa que puede ocasionar alta morbilidad, especialmente en corderos, su curso dista de ser agudo tendiendo más bien a la cronicidad acompañada de infecciones mixtas de otra etiología. Con frecuencia depende de factores externos y se presenta enzooticamente en todo el mundo. Se presenta principalmente en corderos ocasionando graves pérdidas después del -- destete, también se observa durante o después del transporte de los animales, por lo que se denomina Fiebre de Embarque.

(2)

En una presentación aguda de la enfermedad hay depre--- sión orejas caídas, secreción nasal y ocular, tos, pulso y -- respiración aceleradas, temperatura de 41- 42⁰C, enflaquecimiento, hemorragias en distintas partes del organismo, morbi- lidad de 50% y mortalidad de 10%. En casos menos agudos hay- tos espasmódica de 2 - 4 días. En corderos hay generalmen-

una septicemia aguda y muerte en el transcurso de varias horas. (2,8,22,28)

Cuando se inocula parenteralmente en ratón, los bacilos se multiplican extracelularmente libremente entre los tejidos, como resultado todos los órganos y tejidos atravesados llegan a ser infectados en forma masiva en pocas horas con la muerte como resultado en tan solo 24 horas por la endotoxemia producida.

Las bacterias se pueden recuperar fácilmente de sangre, médula ósea, riñones y nódulos linfoides. En cavidad peritoneal se pueden observar un 98% de los bacilos en fase extracelular. (11,12)

Un número considerable de bacterinas comerciales contra la pasteurelisis bovina y ovina han sido desarrolladas. Muchas bacterinas consisten en una mezcla de serotipos, algunas veces combinado con otras bacterias y frecuentemente asociado a virus como producto biológico. (44)

Estudios sobre la inmunidad pasiva indican que la resistencia adquirida es principalmente humoral, presumiblemente por promover la fagocitosis en cavidad peritoneal. Una protección efectiva puede ser adquirida en aves, bovinos y animales de experimentación con una variedad de bacterinas, especialmente cuando son adicionadas con adyuvantes (bacterina precipitada en aluminio). (12).

Los tratamientos que se mencionan a continuación se han utilizado ampliamente en animales con neumonía: penicilina y

estreptomicina, tetraciclinas, sulfonamidas (sulfameracina y sulfametacina). (9)

Salas y col. (1986) reportan un estudio sobre la susceptibilidad a los antibióticos que tienen las pasteurelas - aisladas de ovinos adultos a nivel de rastro y mencionan en este trabajo que todas las cepas aisladas de P. haemolytica y P. multocida fueron resistentes a penicilina y ampicilina - utilizando las pruebas de dilución del antibiótico líquido - y de sensibilización. La mínima concentración inhibitoria de áci de nalidixico, cloranfenicol, eritromicina, sulfas, tetraciclinas probadas con la totalidad de las cepas mostraron multisensibilidad. Burrows (1985) dice que el 90% de los aislamientos de Pasteurella ssp son susceptibles a la eritromicina debido a que este antibiótico alcanza altas concentraciones en el tejido pulmonar al ser estudiada la farmacocinesís.

Estos datos proveen de información que puede ser de utilidad para el clínico de rumiantes que busca efectividad en el tratamiento de las enfermedades producidas por éstas bacterias.

En México el futuro de la producción ovina tiene buenas --- perspectivas así como en otras partes del mundo, ya que son animales que no compiten con la alimentación del hombre y -- puede ser un medio barato de producción de proteína animal y para lograr este fin se hace necesario conocer las enfermedades respiratorias y sus agentes etiológicos para determinar un control de éstas enfermedades. (32)

Es importante considerar la interacción de factores etiológicos para desencadenar procesos patológicos a nivel pulmonar como se menciona en el trabajo realizado por Ramírez y Trigo (1986) en el que se estudia la interacción entre Adenovirus y Pasteurella en donde el virus provoca una descamación y necrosis celular constituyendo un excelente medio de cultivo para bacterias dando como resultado una neumonía necrosante.

También existen otras interacciones de microorganismos como en el caso de parásitos pulmonares cuya importancia patológica radica en que propicia la entrada de bacterias y de algunos agentes virales en el tejido lesionado. (41). En la oveja el virus Parainfluenza III y los micoplasmas son importantes en la Patogénesis de las neumonías. (41,43)

2.) OBJETIVOS

- 1.- Detectar la presencia de Pasteurella multocida tipo D en ovinos adultos - y/o corderos por el método de aislamiento y tipificación bacteriológica.
- 2.- Detectar los antígenos capsulares de Pasteurella multocida con el fin de tener datos más específicos para la elaboración de productos biológicos- contra la pasteurelosis ovina.
- 3.- Determinar si las cepas de Pasteurella multocida aisladas de ovinos producen metabolitos bacterianos capaces de causar necrosis en piel de co bayo.

3.) MATERIAL Y METODOS

Se recolectaron muestras de aparato respiratorio de ovinos, de las que se incluyen 125 muestras de pulmones neumónicos (50 corderos y 75 de ovinos adultos) y 59 muestras de cavidad nasal (16 corderos y 43 de ovinos adultos) sumando un total de 184 muestras, de las que se incluyen 118 animales adultos y 66 corderos.

3.1.) Recolección de muestras a nivel de campo

3.1.1.) Muestras de pulmones de corderos. (50 muestras)

La recolección se realizó en diferentes explotaciones localizadas en Teoloyucan, Zumpango, Jilotepec y Cuautitlan en el Estado de México. Por medio de la técnica de necropsia se seleccionaron los pulmones que presentaban alteraciones patológicas en aparato respiratorio sugerentes de neumonías (hiperemia, edema inflamatorio, hepatización roja, hepatización gris) se obtuvieron muestras de 10 cms. de diámetro de tejido pulmonar aproximadamente. Las necropsias fueron hechas en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan cuando los corderos tenían entre 12 y 24 horas de muertos. En los casos en que el cordero tenía más de 24 horas de haber muerto ó -- que fué imposible trasladar el cadaver del cordero al laboratorio se realizó la necropsia a nivel de campo recolectando las muestras de pulmones, siendo recolectadas en frascos estériles con tapa o en bolsas de polietileno y trasladadas al laboratorio con refrigerantes.

3.1.2.) Muestras obtenidas de cavidad nasal de corderos y ovinos adultos (59 muestras)

Estas recolecciones se hicieron en el módulo de ovinos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, se utilizaron hisopos estériles de 8 cms. de longitud para corderos y de 15 cms. para ovinos adultos. Antes de tomar la muestra se limpiaron los ollares con algodón humedecido en alcohol al 70% para eliminar restos de alimento, tierra o estiércol, -- posteriormente se introdujo el hisopo en la cavidad nasal haciendo presión en las paredes con la porción de algodón del hisopo, después se introdujo parcialmente en un tubo de ensaye y se cortó el extremo del hisopo por donde se sujeto, finalmente se cerró el tapón de baquelita y fueron trasladadas las muestras al laboratorio para inocularlas en cajas de -- agar sangre.

3.2.) Recolección de muestras a nivel de rastro.

3.2.1.) Muestras obtenidas de ovinos adultos en el rastro de Ferrería de la Ciudad de México (75 -- muestras).

Esta recolección se realizó en el momento en que se hacía la inspección sanitaria para hacerla se seleccionaron -- los animales que presentaban alteraciones patológicas a nivel de aparato respiratorio. Se utilizaron pinzas y tijeras de disección, seleccionando zonas de lesión en el tejido pulmonar, zonas de hiperemia edema ó congestión, se obtuvieron muestras de 10 cms. de diámetro de tejido pulmonar y se colg

có en bolsas de polietileno para ser trasladadas al laboratorio en cajas con refrigerantes.

3.2.) Preparación de medios de cultivo

A continuación se hace mención de los medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo para aislamiento primario, purificación de cultivos y para pruebas de identificación -- bacteriana.

a.) Agar sangre.- se hizo la hidratación de base para agar sangre (DIBICO) con agua destilada en proporción de 40-grs. por litro, se clarifico y posteriormente se esterilizó a 121°C , 15 Lb. de presión durante 15 minutos. Después de esterilizar se dejó que bajara su temperatura a $50-55^{\circ}\text{C}$ para añadir 5% de sangre desfibrinada de bovino, haciendo un movimiento giratorio del matraz se homogeneizo la cantidad de -- sangre adicionada. Posteriormente se sirvió 25 a 30 mililitros por caja de Petri estériles, se dejaron gelificar y posteriormente se sometieron a prueba de esterilidad incubando las cajas de agar sangre a 37°C durante 24 horas. Después de ésta prueba se utilizaron para aislamiento primario ó para purificación de cultivos, en caso de que no se utilizaran en ese momento se almacenaron en refrigeración a una temperatura de $4 - 10^{\circ}\text{C}$. (20)

- b.) Agar Infusión Cerebro Corazón (B.H.I.) (Bioxon)
- c.) Agar Mac Conkey (MERK)
- d.) Medio de Hügh-Leifson para prueba de O/F (DIFCO)
- e.) Agua peptonada para prueba de ácido de la glucosa -
(20,31)

f.) Caldo Infusión Cerebro Corazón (B.H.I.) (Bioxon)

Estos medios de cultivo se prepararon según indicaciones del laboratorio fabricante.

g.) Medio de Azufre-Indol-Motilidad Raffinosa (S.I.M.Raffinosa).- Se preparó la base para agua peptonada y con esta se hizo la hidratación del medio de S.I.M. (DIFCO) en proporción de 36 grs. por litro de medio, posteriormente se esterilizó a 110°C, 10 Lb., 10 min., se dejó que bajara su temperatura a 50 - 55°C aproximadamente y se adicionó una solución de agua destilada estéril y azúcar raffinosa utilizando un filtro millipore con membrana de 0.2 micras para esterilizar la solución, los tubos de ensaye se sirvieron con cantidad de 2.5 ml. de medio de S.I.M. más 0.5 ml. de solución de raffinosa, finalmente se sometieron a prueba de esterilidad en la estufa bacteriológica antes de ser utilizados (31,37)

3.4.) Aislamiento e identificación de Pasteurella multocida.

Las muestras de tejido pulmonar fueron selladas en sus superficies con una espátula calentada al rojo vivo, previamente fue desinfectada con formol o con fenol, posteriormente se realizó una incisión con bisturí ó tijeras estériles, el asa bacteriológica se esterilizó en la flama del mechero y se dejó enfriar para tomar una asada de la muestra de tejido pulmonar interno y posteriormente se inoculó en la superficie de una caja de agar sangre, se realizó la técnica americana de dilución de colonias bacterianas en este período -

se prolongo la incubación por 48 a 72 horas. (20)

Una vez que se observó el crecimiento bacteriano se seleccionaron las colonias que reunían características propias del género *Pasteurella* para ser resemebradas y purificadas en cajas de agar sangre, en este medio se verificó si se producía o no la hemólisis y a partir de las colonias purificadas se hizo la tinción de Gram para determinar la morfología microscópica de la bacteria y verificar si se había logrado la purificación del cultivo. (20)

La tinción de Gram se realizó como lo reporta Carter (-1968) haciendo la siguiente interpretación.

- Gram positivo.- bacterias de color azul ó morado.
- > - Gram negativo.- bacterias de color rojo.

Después de observar las tinciones se fueron seleccionando los cultivos que estaban constituidos por bacilos ó cocobacilos gram negativos para continuar con las pruebas mínimas necesarias para identificar el género bacteriano.

3.5.) Purificación de colonias por inoculación a ratones

El objetivo fué favorecer el desarrollo de la bacteria dentro de los ratones ocasionando una septicemia para posteriormente recuperar la cepa recapsulada. (8,9)

En los casos de las muestras que presentaban dos ó más morfologías de colonias bacterianas en las cajas de agar, se hicieron una ó dos resiembras con la finalidad de purificar el cultivo, en caso de no lograr su purificación se procedió

a sembrar la muestra en caldo nutritivo o en caldo B.H.I. in cubándose por 18-24 horas en la estufa bacteriológica y que posteriormente fué inoculada con jeringas insulfónicas de 1 - ml. y agujas de calibre 26 la cantidad de 0.5 ml. de cultivo por vía intraperitoneal (IP) en ratones albinos con peso de 80-100 gr., a las 24 horas se sacrificarón los ratones que no habfan muerto por septicemia, se recolectaron los hfgados de cada uno de los ratones con el fin de inocularlos en cajas de agar sangre e inclubarlas durante 24 horas a 37⁰C, para - esta prueba se utilizó un ratón para cada muestra.

3.6.) Pruebas para identificación bacteriana.

a.) Prueba de Oxidación-Fermetación.- las muestras se sembraron en medio de Hügh-Leifson por duplicado para cada cepa, se inocularon por picadura y posteriormente se colocó un tapón de vaselina lsquida estéril en uno de los tubos, la incubación se efectuó en la estufa bacteriológica por 24 hrs. a 7 días a una temperatura de 37⁰C. (14,20)

Se considera que la bacteria aprovecha la glucosa por oxidación o por fermentación, por el cambio de coloración -- del medio, a color amarillo debido a la presencia del indica dor azul de bromotimol. (20)

b.) Prueba de Acido de la Glucosa.- Se sembró en medio de agua peptonada por agitación y se dejó en incubación 24 - horas a 37⁰C, se consideró positivo al aprovechamiento de -- glucosa cuando el medio cambio a color rosa (pH ácido). (14)

c.) Prueba de S.I.M. Raffinosa.- para esta prueba se --

utilizó el medio de S.I.M. adicionado de raffinosa, fue inoculado por picadura y se dejó en incubación a 37°C por 24 horas prolongando la incubación hasta 72 horas en caso de no observar crecimiento bacteriano a las 24 horas. Debido a que esta es una prueba múltiple la lectura y la interpretación se hicieron de la siguiente forma:

- Se consideró positivo a raffinosa cuando la columna del medio cambió a color rosa.
- Se consideró positivo a ácido sulfhídrico cuando se observó un precipitado de color negro.
- Se consideró positivo a motilidad cuando el crecimiento bacteriano se extendió desde la zona de inoculación hasta otras partes del medio.
- Se consideró positivo a indol cuando después de adicionar el reactivo de Ehrlich o el reactivo de Kovac's se formó un anillo de color rojo en la superficie del medio. (31,37)

d.) Pruebas de Oxidasa y Catalasa.- se sembraron las muestras en agar B.H.I. y después de incubar a 37°C por 24 horas se tomaron muestras de colonias con palillos de madera estériles para realizar estas dos pruebas. (20)

A partir de estos cultivos también se realizó la técnica de gota suspendida para verificar la motilidad de las bacterias en caso de que el resultado fuera dudoso en la prueba de S.I.M. Raffinosa. (20)

e.) Aprovechamiento de la lactosa.- También se resembr

ron en agar MacConkey las cepas aisladas para hacer la identificación de Pasteurella haemolytica ya que es la única especie dentro del género capaz de desarrollar en este medio - después de la incubación de las cepas de P. haemolytica produjeron colonias lactosa negativas. Esta prueba también se utilizo para hacer la diferenciación de enterobacterias junto con las pruebas primarias. (20)

f.) Prueba de aprovechamiento de la urea.- se sembraron medios de caldo urea por agitación y se incubaron por 1-7 --- días considerandose positivos a ureasa cuando el medio cambio a color rojo, esta prueba se realizó con la finalidad de diferenciar la especie de Pasteurella ureae. (14,20,31)

3.7.) Tipificación de Pasteurella multocida.

3.7.1.) Prueba de hialuronidasa.- Esta prueba se realizó sembrando una caja de agar sangre con cepas de P. multocida, la inoculación se hizo abarcando toda la superficie del medio de cultivo, posteriormente se trazó una estria central con una cepa de Staphylococcus aureus y se incubó a 37°C por 24 horas. Se consideraron positivas a hialuronidasa las cepas que mostraron un crecimiento de colonias pequeñas y poco brillantes en proximidad a la cepa de S. aureus y las colonias alejadas a esta estria fueron grandes y brillantes las bacterias hialuronidasa positivas se determinaron como P. -- multocida tipo A. (30)

3.7.2.) Prueba de Acriflavina.- Se inocularon las cepas

de P. multocida en el caldo B.H.I. y se incubaron a 37^oC por 18-24 horas, cada tubo contenía 3 ml. de cultivo, posteriormente se centrifugaron estos cultivos a 3000 R.P.M. durante 10 min. para sedimentar el paquete celular y retirar 2.5 ml. de sobrenadante, quedando 0.5 ml. de cultivo bacteriano en el que se adicionó 0.5 ml. de solución de acriflavina 1:1000, esta solución se preparó previamente con agua destilada estéril y se mantuvo en refrigeración en un recipiente color ámbar para evitar que la luz alterara la preparación. Después de adicionar la acriflavina se dejó a medio ambiente durante 10 minutos para hacer la lectura de la prueba. Se consideró positivo a acriflavina cuando se observó formación de grumos consistentes en el medio de color anaranjado, considerando pertenecientes al tipo D. (7,30)

3.8.) Obtención del sobrenadante de cultivos de P. multocida tipo D.

Una vez identificadas las cepas de P. multocida tipo D se inocularon en caldo B.H.I. y se incubaron a 37^oC por 24 horas, se verificó el crecimiento bacteriano y después se sometieron a centrifugación a 3500-4000 R.P.M. durante 30 min. y posteriormente se recuperó el sobrenadante en una jeringa estéril y se procedió a filtrarlo, para esto se utilizó el filtro millipore estéril con membrana de 0.22 micras para obtener el extracto crudo de la toxina del microorganismo. (35,38,48)

Teniendo las precauciones de trabajar con material estéril

ril y evitando al máximo mantener los cultivos por períodos de tiempo prolongados a medio ambiente, se mantuvieron en -- refrigeración (4-10°C) hasta que fueron inoculados los animales destinados para las pruebas de letalidad y dermonecrosis. (35.38.48)

3.9.) Bioensayos.

3.9.1.) Prueba de Dermonecrosis.- Para realizar esta -- prueba se utilizaron tres cobayos hembras con pesos de 300 - a 500 gramos, variedad de color blanco. (35)

Estos animales fueron obtenidos en la granja "Tepoxpica" de donde fueron trasladados al laboratorio, donde se mantuvieron en observación durante 10 días antes de ser inoculados con la finalidad de ser adaptados al microclima del laboratorio.

Después del período de adaptación se recortó el pelo - del costado derecho, abarcando desde la región torácica hasta la región lumbar, se rasuró con navaja y rastrillo, posteriormente se lavó el área con agua y jabón y se le aplicó -- vaselina sólida para evitar irritaciones en la piel, se marcaron una serie de seis divisiones en cada uno de los coba--yos rasurados para inocular las muestras de sobrenadante.

Se inocularon 5 muestras de sobrenadante y un control - negativo (caldo B.H.I. estéril) en cada uno de los cobayos con jeringas insulínicas estériles y agujas de calibre 26 -- la cantidad de 0.2 ml. de extracto crudo de toxina de las cepas de P. multocida tipo D por vía subcutánea.

Se mantuvieron en observación los cobayos inoculados -- durante 7 días, anotando los cambios que mostraron las zonas inoculadas a las 24,48 y 72 horas.

3.9.2.) Prueba de Letalidad.- para esta prueba se utilizaron 17 ratones albinos con pesos entre 30 y 50 gramos siendo inoculados con jeringas isulínicas y agujas calibre 26 -- estériles con 0.2 ml. de muestra de sobrenadante de cultivos de P. multocida tipo D por vía intraperitoneal, para cada -- muestra se utilizó un ratón, se inocularon dos ratones con - caldo B.H.I. estéril como controles.

4.) RESULTADOS

Se recolectaron un total de 184 muestras destinadas para análisis bacteriológico. De estas muestras 109 correspondieron a recolecciones de campo las cuales fueron divididas en dos grupos, el primero correspondió a 50 casos clínicos de corderos muertos y de los cuales se determinó que la causa de mortalidad fue neumonía, 59 muestras fueron recolectadas de cavidad nasal de corderos y de ovinos adultos, correspondieron al segundo grupo. El tercer grupo fue de 75 muestras recolectadas en el rastro, estas muestras se seleccionaron durante la inspección sanitaria, se recolectaron los pulmones que presentaban lesiones neumónicas. Las muestras de estos tres grupos fueron analizadas obteniéndose los siguientes resultados.

Grupo I .- Muestras de corderos (casos clínicos).

De 50 muestras trabajadas se aislaron 12 cepas de P. multocida de las cuales 4 correspondieron al tipo A, 6 al tipo-D y 2 no pudieron ser tipificadas ya que resultaron negativas a las pruebas de hialuronidasa y de acriflavina. De las demás muestras se lograron aislar 7 cepas de P. haemolytica, - 13 aislamientos correspondieron a los géneros bacterianos -- Staphylococcus spp., Streptococcus spp. y Enterobacterias, 12 de las muestras no mostraron crecimiento bacteriano. (Cuadro Nº 1).

Grupo II .- Muestras de cavidad nasal de ovinos.

Se trabajaron un total de 59 muestras en este grupo de

las cuales se aislaron 13 cepas de P. multocida, 2 correspondieron al tipo A y 8 al tipo D, otras 3 cepas no pudieron -- ser tipificadas del número restante de muestras 30 correspondieron a los géneros Staphylococcus spp. y Streptococcus spp en base a los resultados obtenidos en las pruebas primarias. De 10 muestras no se logró hacer aislamiento bacteriano. (-- Cuadros 1 y 2)

Grupo III .- Muestras de pulmones neumónicos de ovinos-sacrificados en el rastro.

De este grupo se trabajaron 75 muestras de las que se - aislaron 2 cepas de P. multocida, 1 del tipo A y una del tipo D, 16 aislamientos correspondieron a P. haemolytica. De - acuerdo con los resultados de las pruebas primarias 36 aislamientos correspondieron a los géneros Staphylococcus, Streptococcus y Enterobacterias, 21 muestras trabajadas no mostraron crecimiento bacteriano. (Cuadro Nº 1)

CUADRO NUMERO 1.

Aislamientos y tipificación de Pasteurella multocida

GRUPO	<u>P. multocida</u>	Tipo A	Tipo D	No tipificada
I (50 muestras)	12 (24%)	4 (8%)	6 (12%)	2 (4%)
II (59 muestras)	13 (22.03%)	2 (3.38%)	8 (13.55%)	3 (5.08%)
III (75 muestras)	2 (2.66%)	1 (1.3%)	1 (1.3%)	0 (0%)

Grupo I: muestras de campo (casos clínicos de corderos)

Grupo II: muestras de campo (flora bacteriana de cavidad nasal de ovinos adultos y corderos)

Grupo III: muestras de rastro (pulmones neumónicos de ovinos adultos).

CUADRO NUMERO 2

Aislamiento y tipificación de P. multocida a nivel de campo a partir de muestras de cavidad nasal de corderos y de ovinos adultos. (Grupo II)

	<u>P.multocida</u>	Tipo A	Tipo D	No tipifi cada.
<hr/>				
Corderos				
(16 muestras)	5	2	1	2
	(31.25%)	(12.5%)	(6.25%)	(12.5%)
<hr/>				
ovinos adu <u>l</u>				
tos.				
(43 muestras)	8	0	7	1
	(18.60%)	(0%)	(16.27%)	(2.32%)
<hr/>				

4.1.) Prueba de Dermonecrosis en Cobayos

De las muestras trabajadas se logró aislar 15 cepas de P. multocida tipo D. de estas cepas se hizo la separación -- del sobrenadante, posteriormente se inoculó en cobayos por -- vía intradérmica y se observó la reacción en la piel a las -- 24 , 48, 72 y 96 horas postinoculación (Cuadro Nº 3) obte--- niendo los siguientes resultados :

a.) Tres sobrenadantes de cultivos de P. multocida ti-- po D, fueron positivos a dermonecrosis, 1 a las 24-48 horas postinoculación y 2 a las 72-96 horas postinoculación.

b.) Siete sobrenadantes de cultivos de P. multocida ti-- po D, mostraron una reacción atípica a las 24-48 horas postinoculación.

c.) Cinco sobrenadantes de cultivos de P. multocida ti-- po D, resultaron negativos a dermonecrosis.

4.2.) Prueba de Letalidad en Ratón.

De las 15 cepas de P. multocida se obtuvo el sobrenadante de cada uno de los cultivos, posteriormente fué inoculado en ratones por vía intraperitoneal (IP) haciendo la lectura a las 24 y 48 horas postinoculación, no se observó letalidad en los ratones inoculados con el sobrenadante a las 24 ni a las 48 horas únicamente se observó decaimiento, erizamiento -- del pelo, deshidratación y malestar general entre las 24 y -- 48 horas postinoculación y después de este período mostraron su vitalidad normal. los ratones controles mostraron--

ninguna alteración fisiológica después de la inoculación de caldo B.H.I. estéril por vía I.P.

CUADRO NUMERO 3

Prueba de Dermonecrosis en cobayos

Grupo	Cepa	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
I	I-a	induración	(-)	(-)	(-)
	I-b	eritema	induración	(-)	(-)
	I-c	eritema	eritema/ind.	induración	(-)
	I-d	eritema	eritema/ind.	(-)	(-)
	I-e	eritema	eritema/ind	(-)	(-)
	I-f	(-)	(-)	(-)	(-)
II	II-a	eritema	eritema/ind.	(-)	(-)
	II-b	(-)	(-)	(-)	(-)
	II-c	erit/ind.	erit./ind.	erit./necrosis	necrosis
	II-d	(-)	(-)	(-)	(-)
	II-e	(-)	(-)	(-)	(-)
	II-f	erit./necro sis.	erit./necro sis.	necrosis	necrosis
	II-g	(-)	(-)	(-)	(-)
	II-h	erit./ind.	induración	(-)	(-)
III	III-a	erit./ind.	erit./ind.	necrosis	necrosis

5.) DISCUSION.

Una serie de trabajos recientemente realizados en diferentes instituciones de investigación hacen mención a la importancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos y ovinos adultos. En este estudio se hizo una investigación para conocer los tipos de P. multocida involucrados en la pasteurelisis ovina y su importancia en la mortalidad en los corderos, se observa, que el porcentaje de aislamientos de Pasteurella multocida en este estudio es de 14.6% similar al reportado por Martínez y col. (1985) de 16.3% de aislamientos de este microorganismo. (32)

El haber aislado muestras de corderos y ovinos adultos permite hacer una comparación de la prevalencia de la pasteurelisis en ovinos de diferentes edades, así se encontró que el 25.7% de los aislamientos de P. multocida se hicieron de corderos con edad entre los 0 y 90 días, este porcentaje debe ser considerado ya que concuerda con los reportes de Dennis (1974), Buxton y Fraser (1977) y Trigo (1984) en donde se considera a P. multocida como uno de los microorganismos involucrados en la mortandad en corderos. (17,47)

En ovinos adultos se encontró una prevalencia de 12.7% de aislamientos de P. multocida, este resultado sugiere que la pasteurelisis en ovinos por esta bacteria no es la enfermedad de mayor importancia dentro del complejo neumónico, es to también se concluye en el estudio hecho por Hernández y col. (1981) sobre bacteriología y micología de pulmones neu-

mónicos de ovinos y caprinos en donde se encontró que la prevalencia de P. multocida fué de 2.5% (25) Sin embargo estos datos se contraponen al reporte de Trigo y Romero (1986) en donde hacen referencia al estudio de Erguiliz (1984) quién dice que los principales agentes bacterianos productores de neumonías en ovinos adultos son Pasteurella multocida y Pasteurella haemolytica. (47)

Se ha determinado que el género Pasteurella se asocia frecuentemente a otros microorganismos como micoplasmas, virus PI-3 ó adenovirus. (30,39,40,43) Estas asociaciones de microorganismos pueden dar cuadros bastante severos de neumonías que en corderos llegan a causar su muerte en cuestión de horas, sin embargo el hecho de que P. multocida tipo D tenga algunas cepas toxigénicas hace pensar que esta característica aumente la virulencia del microorganismo pudiendo -- ocasionar por si solo cuadros neumónicos graves. Esto lo demuestra el trabajo realizado por Toyotsugu N. y col. (1984) donde se mencionan que las cepas toxigénicas de P. multocida causan rinitis atrófica en cerdos por si solas, también en el trabajo reportado por Richard y col. (1986) en donde se menciona que la toxina de cepas de P. multocida tipo D causa la letalidad en ratón y en pollo. (42). En el presente trabajo no se observó letalidad en ratón pero si se pudo observar que la inoculación de sobrenadante de cultivos bacterianos de P. multocida tipo D causó alteraciones fisiológicas en los ratones.

De 41 especímenes trabajados en el laboratorio de bacteriología no se lograron aislar bacterias. Esto sugiere que la causa de neumonía en estos casos sea laguna bacteria de requerimientos nutricionales estrictos, ó bien que tuviera una etiología viral, micótica ó parasitaria. (17,24,32,41) - En el Trabajo de Hernández y col. (1981) se observó que de 139 muestras de pulmones neumónicos 60 no presentaron crecimientos de colonias bacterianas ó micóticas (24), y en el trabajo reportado por Martínez y col. (1985) de 219 cadáveres de corderos solo se logró hacer aislamiento bacteriano de -- 102 muestras. (32)

Hasta 1986 se demostraron cepas toxigénicas de P. multocida aisladas de conejo, cerdo y pavo y se encontró que eran letales para ratón, conejo, cerdo y pavo. (38,45,49) En los datos que proporciona este estudio se extiende esta información hacia la posible existencia de cepas toxigénicas aisladas a partir de aparato respiratorio de ovinos adultos y/o corderos detectadas por la prueba de inoculación intradérmica en cobayos, esta prueba da una correlación de 100% con otras pruebas más sofisticadas como es el efecto citopático - en células Vero. (37)

Se aislaron tres cepas toxigénicas de factor DNT observándose que al obtener el extracto de la toxina e inocularlo en cobayos la dermonecrosis se presentó en diferentes periodos, esto probablemente se deba a que dentro de las cepas -- dermonecroticas haya cierta variación en cuanto a su capacidad para producir toxina.

Estas cepas positivas y la cepas con reacción atípica a dermonecrosis no mostraron letalidad en ratón, probablemente -- por ser cepas poco toxigénicas cuando se aíslan de ovinos. -- quizá si se hacen pruebas de letalidad en conejo, pavo ó cor-- dero se pueda observar letalidad como se observó en el estu-- dio realizado por Richard y col. (1986). No se llevo a efec-- to pruebas de letalidad en otras especies diferentes al ra-- tón por carecer de las instalaciones adecuadas.

Los resultados negativos observados en la prueba de le-- talidad en ratón y las reacciones atípicas de 7 cepas aisla-- das de P. multocida tipo D se presentó como en otros estudios en donde se ha logrado purificar la toxina por haber trabaja-- do con técnicas más sofisticadas y donde también se han en-- contrado cepas productoras de toxina con reacción atípica a-- la prueba de dermonecrosis. (49)

Así mismo el origen geográfico de donde proceden las -- muestras puede determinar cierta variación en la capacidad-- toxigénica por lo que se sugiere ampliar esta investigación-- haciendo aislamientos de cepas procedentes de diferentes es-- tados del país, sobre todo de aquellos en los que se esta -- dando impulso a la ovinocultura.

6.) CONCLUSIONES

1.- De 184 muestras trabajadas en el laboratorio de bacteriología se encontró una prevalencia de 14.6% para Pasteurella multocida y de estos aislamientos el 55.5% correspondió al tipo D y el 25.9% al tipo A. El porcentaje de aislamientos de P. multocida debe ser considerado tomando en cuenta la gran cantidad de agentes etiológicos de las neumonías en ovinos. Los porcentajes de aislamientos de los tipos A y D deben considerarse para la elaboración de productos biológicos para prevenir brotes de neumonías en las explotaciones ovinas.

2.- En muestras de corderos se encontró que el 25.7% de los aislamientos correspondieron a P. multocida y en ovinos adultos se encontró 12.7% de aislamientos para este microorganismo. Lo que determina que la pasteurelisis en los ovinos afecta más comunmente a animales jóvenes.

3.- En corderos se encontró una prevalencia de 41.1% para el tipo D y de 35.2% para el tipo A. En ovinos adultos la prevalencia para el tipo D fue de 80% y para el tipo A de 10%. Estos datos sugieren que el tipo D debe incluirse en una mayor proporción en bacterinas elaboradas con P. multocida.

4.- Del total de muestras sometidas a análisis bacteriológico se aislaron 15 cepas de P. multocida tipo D que corresponden al 8.1%. De estas cepas se encontró que el 20% (3 cepas) fueron positivas a dermonecrosis, 46.6% (7 cepas) mostraron-

una reacción atípica a la misma y el 33.3% (5 cepas) resultaron negativas.

5.- Se encontró que el sobrenadante de P. multocida al ser inoculados por vía intraperitoneal en ratón no causó mortalidad pero sí algunas alteraciones fisiológicas (decaimiento, deshidratación). Aunque no se observó mortalidad estas alteraciones determinan en parte la patogenicidad que tienen los metabolitos presentes en el sobrenadante de cultivos de esta bacteria al ser inoculados en el ratón.

7.) BIBLIOGRAFIA.

1.- Aguilar F., Jaramillo L. y Trigo F.J.: Serotipos de Pasteurella haemolytica aislados a partir de pulmones neumónicos de bovinos. Reunión Anual de Investigaciones Pecuarias en México 1985 (Memorias) México D.F. pag. 73 F.M.V.Z. - U.N.A.M. Méx. 1985

2.- Beer Joaquín.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. Acribia España 1^a ed. 1981.

3.- Blood D.C. and Henderson J.A.: Medicina Veterinaria 4^a ed. Interamericana México 1974.

4.- Brogden K.A. Ph D., Rimbler R.B. Ph D., Cutlin R.C. UMV. Ph D., and Lehmkuhl H.D. Ph D.: Incubation of Pasteurella haemolytica and Pasteurella multocida lipopolisaccharide with sheep lungsurfactant. Am. V.Vet. Res. 47: 47 (1986).

5.- Burrows G.E. DMV. Ph D.: Effects of experimentally induced Pasteurella haemolytica pneumonia on the pharmacokinetics of eritromicin in the calf. Am. J. Vet. Res. 46: 798-802 (1985).

6.- Carter G.R. DMV. M.S.: Studies on Pasteurella multocida I. a. Hemagglutination Test for the Identification of -- Serological Types. A.M.J. Vet. Rev. 481-484 (1955).

7.- Carter G.R. DMV. M.S.: Studies en Pasteurella multocida Identification of Antigenic Characteristics and Colonial Variants, Am. J. Vet. Rev. 210-213 (1957)

8.- Carter G.R.: Procedimientos de Diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinarias. Acribia España 1968.

9.- Carter G.R.: Bacteriología y Micología Veterinaria. Aspectos Esenciales. Charles C. Thomas Publisher. 1975.

10.- Ciprian C.A.: Memorias del Cruso Bases de la Cria Ovina ed. Pijoan P. y Arbiza. Toluca Méx. 1984.

11.- Colín R.F., Candanosa I.E., de Buen A.N., Merino - M.M. y Trigo F.J.: Correlación citohistológica y hallazgos bacteriológicos en pulmones neumónicos de ovinos. Reunión -- Anual de Investigaciones Pecuarias en México 1986. (Memorias) pag. 235 F.M.V.Z. U.N.A.M. México (1986).

12.- Collins F.M.: Mechanisms of acquired Resistance to Pasteurella multocida Infection. A review. Cornell Vet. 67 pp. 103-138 New York 1977

13.- Correa G.P.: Enfermedades Virales de los Animales-Domésticos Poligástricos 4^a ed. México 1982.

14.- Cowan S.T. and Steel K.J.: Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica 1^a ed. Compañía -- Editorial Continental S.A. Méx. 1969.

15.- Cutlip R.C. and Lehmkuhl H.D.: Pulmonary lesions - in Lambs Experimentally Infected with Ovine Adenovirus 5 -- Strain RTS 42. Vet. Pathol. 23: 589-593 (1986).

16.- Davis B.D., and Dulbecco R.: Tratado de Microbiología Salvat. 2^a ed. pp. 835-837. Barcelona España 1978.

17.- Dennis S.M.: Perinatal Lamb Mortality in West Australian Vet. J. pp/ 502-510, 50 (1974)

18.- Ellis J.A. and De Martini J.C.: Immunomorphologic and Morphometric Changes in Pulmonary Lymph Nodes of Sheep - Whit Progressive Pneumonia. Vet. Pathol. 22 : 31-41 (1985)

19.- Ensminger M.: Producción Ovina. 4^a ed. El Ateneo-México 1973.

20.- García T.R. y Córdova P.R.: Manual Ilustrado de -- las Técnicas de Laboratorio Utilizadas en Microbiología Veterinaria Bacteriología y Micología. Tesis. F.E.S. Cuautitlán-U.N.A.M. 1985.

21.- Gómez D.A., Sánchez R. y Martínez L.P.: Estudio -- Microscópico de las lesiones producidas por Linguatula serrata en hígado y pulmones de ovinos y caprinos. Reunión Anual de Investigaciones Pecuarias en México 1986 (Memorias) pag.- 216 F.E.S. Cuautitlán U.N.A.M. (1986).

22.- Haggan and Bruner.: Enfermedades Infecciosas de -- los Animales Domésticos. 4^a ed. La Prensa Médica. Méx. 1983.

23.- Hernández D., Mateos A. y Barrón C.: Causas más -- frecuentes de mortalidad en corderos en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (COPEA). (Memorias) Reunión Anual de Investigaciones Pecuarias en México 1985. pag. 189. Méx. 1985.

24.- Hernández L.G., Ramírez C.L., Vásquez C.A. y Pijoan

A.C: Bacteriología y Micología en pulmones neumónicos de ---
Ovinos y Caprinos. XII Congreso Nacional de Microbiología (-
Resúmenes) pp. 9-10 Yucatán Méx. 1985.

25.- Jaramillo L., Aguilar F., Merino M., Trigo F.J y -
Martínez H.A.: Serotipos de Pasteurella haemolytica involu-
crados en pasteurelisis pulmonar ovina. (Memorias) Reunión -
Anual de Investigaciones Pecuarias en México. pag. 72 Méx. -
1985.

26.- Jawetz E., Melnick E.A.: Manual de Microbiología -
Médica 9ª ed. El Manual Moderno. México. 1983.

27.- Jensen R.: Diseases of Sheep 1ª ed. Lea and Fabi-
ger pp. 99-101. 1974.

28.- Jub K.B.F. and Kennedy P.C.: Pathology of Domestic
Animals. Academic Press 1ª ed. 1970.

29.- Lapage G.: Parasitología Veterinaria. Compañía Edi-
torial Continental. 2ª ed. México 1968. -

30.- Licea V.A.: Aislamiento y Tipificación de Pasteure-
lla multocida de pulmones neumónicos de Cerdo en la Piedad -
Michoacán (Tesis) E.N.E.P. Cuautitlán U.N.A.M. Méx. 1980.

31.- Mac Faddin J.P.: Biochemical Test for Identifica-
tion of Medial Bacteria 1ª ed. The William and Wilkins 1979.

32.- Martínez H.A., Ochoa U.G. Hernández J.S., Tortora-
P.J. y Pijoan A.P.: Principales agentes bacterianos aislados
de cadáveres de corderos del Estado de México. (Memorias) --

Reunión Anual de Investigaciones Pecuarias en México 1985.
pp. 68 Méx. 1985.

33.- Montes de Oca J.R., Velázquez O.V. y Martínez R.C.:
Causas de mortalidad en corderos de 0-90 días en el Valle de
Toluca. (Memorias) Reunión Anual de Investigaciones Pecuarias
en México 1985 pag. 108 Méx. 1985.

34.- Munguia O.M.L.: Mortalidad en corderos del nacimiento
al destete. Reunión Anual de Investigaciones Pecuarias
en México (Memorias) pag. 238 S.A.R.H. Méx. 1986.

35.- Penning A. and Storn P.R.: A test in Vero Cell mono
layers for toxin production by strains of Pasteurella multo-
cida isolated from pigs suspected of having Atrophic Rhinitis
Vet. Microbiology 9: pp. 503-508 Amsterdam (1984).

36.- Pijoan C., Ciprian C., y Lastra A.G.: Manual de --
Identificación de Bacterias de Interés Veterinario. 2^a ed. -
E.N.E.P. Cuautitlán U.N.A.M. Méx. 1968.

37.- Pijoan C. y Ochoa G.: S.I.M. Raffinosa, un medio -
para la identificación rápida de Pasteurella multocida. Reu-
nión Bianual de Microbiología pag. 13 Toluca Méx. 1978.

38.- Pijoan C., Lastra A., Ramírez C. y Leman.: Isola-
tion of toxigenic strains of Pasteurella multocida from lungs
of neumonics swine. V. Am. Vet. Med. Assc. 185: pp 522-523.-
(1984)

39.- Ramírez R., Trigo F.J. y Aguilar S.: Informe de un

brote de neumonía ovina producida por adenovirus. Rev. Vet. Méx. 15 : 522-523. México (1984).

40.- Ramírez R., y Trigo F.: Infección por adenovirus-- en bovinos y ovinos. Estudio Recapitulativo. Rev. Vet. Méx. 17 : pp 11-113 México (1986).

41.- Ramírez V.G.: Estudio sobre incidencia de neumonías en ovinos y caprinos sacrificados en cuatro rastros del alti planos de México. (Tesis) F.E.S.C. U.N.A.M. México 1979.

42.- Richard B.R. and Brogden K.A.: Pasteurella multocida isolated from rabbits and swine serologic types and toxin production, Am. J. Vet. Res. 47 : pp 730-736 (1986)

43.- Roberts E.D., Switzer W.P. and L'ecuyer C.: Influence of Pasteurella multocida and Mycoplasma hyorhinis. (PPLO) on the histopatology of field cases of swins pneumonia. Vet. Med. Res. Inst. pp. 306-327 (1961)

44.- Rosenstein E.: Prontuario de-Especialidades Veteri narias. 7^a ed. pp. 36-38 Centro Profesional de Publicaciones Méx. 1983.

45.- Rutler J.M. and Luther PLD.,: Cell culture assáy - for toxigenic Pasteurella multocida from atrophic rhinitis - of pigs.Vet. Records 114: pp 393-396 (1984).

46.- Salas T.E., Aguilar R.F., Trigo F. y Jaramillo M.L.: Sensibilidad de cepas de Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida aislados de bovinos y ovinos a varios agentes-

antimicrobianos. REunión Anual de Investigaciones Pecuarias en México 1986. (Memorias) pag. 220 Méx. 1986.

47.- Smith H.A., Jones T.C. and Hunt R.D.: Veterinary - Pathology. 4^a ed. Iea and Fabiger 1972.

48.- Trigo F.R. y Martínez J.R.: La relevancia de las - neumonías como causa de mortalidad en corderos (Nota Informa - tiva). Vet. Méx. 17 : pp 116-119 México 1986.

49.- Toyotsugu N., Akiras S., Masayoshi T., Yuji S and - Katsumi K.: Purification of dermonecrosis toxin from a sonic extract of Pasteurella multocida SP-72 serotype D. Infect. - Immun. 46 : pp 429-434 (1984).