



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2023; 14:1-11. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.101>
Artigo Original. Recebido: 10/05/2023. Aceito:17/11/2023. Publicado: 30/12/2023. Chave: e2023-101.
<https://www.youtube.com/watch?v=FCJCChODYkU>

Caracterização de isolados de *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* obtidos de crianças com problemas respiratórios

Characterization of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from kids with respiratory problems



Imelda Martínez-Razo^{1ID}, Erika Palomares-Resendiz^{2ID}, Francisco Trigo-Tavera^{1ID},
Luis Gómez-Nuñez^{2ID}, Francisco Aguilar-Romero^{2ID}, Efrén Díaz-Aparicio^{*2ID}

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Coyoacán, Ciudad de México, 04510, México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CENID Salud Animal e Inocuidad, Ciudad de México, 05110, México. *Autor responsável e para correspondência: Díaz Aparicio Efrén CENID Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. E-mail: imeldamr_1@hotmail.com, palomares.erika@inifap.gob.mx, crai@unam.mx, nunez.luis@inifap.gob.mx, mvzfranciscoaguilar@yahoo.com.mx, diaz.efren@inifap.gob.mx

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar e determinar a presença de *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* isoladas de crianças com problemas respiratórios no México. Foi realizada uma amostragem por conveniência em sete estados do México, obtendo-se 1.498 amostras de exsudato nasal de crianças. As amostras foram inoculadas em placas de ágar sangue, os isolados foram submetidos a testes bioquímicos para determinar o gênero e a espécie, e foram encontrados 535 isolados, dos quais 491 foram identificados como *M. haemolytica* e 44 como *P. multocida*. Cinquenta isolados de *M. haemolytica* foram selecionados aleatoriamente para caracterização por PCR em tempo real e PCR de ponto final, e a identificação molecular por ambos os testes foi confirmada em 46 dos 50 isolados. O tipo capsular e o biótipo foram determinados para os 44 isolados de *P. multocida*, sendo que 36 eram do tipo A e 8 do tipo D.

Palavras-chave: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, crianças, México.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize and determine the presence of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from kids with respiratory problems in Mexico. Convenience samplings were carried out in seven states of Mexico, obtaining 1,498 samples of nasal exudate from kids, the samples were inoculated on blood agar plates, and the isolates underwent biochemical tests to determine gender and species, finding 535 isolates, of which 491 were identified as *M. haemolytica* and 44 as *P. multocida*. Fifty isolates of *M. haemolytica* were randomly selected to be characterized with real-time PCR and endpoint PCR, confirming molecular identification in 46 of the 50 isolates. The capsular type and biotype of the *P. multocida* isolates were determined, finding that 36 isolates corresponded to type A and eight isolates to type D.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, kids, Mexico.



INTRODUÇÃO

A população caprina no México ultrapassa 8,7 milhões de cabeças e tem uma produção de carne em carcaça de mais de 77.000 toneladas e uma produção de leite de mais de 160.000 litros. A rentabilidade da caprinocultura no México está na produção de carne para venda e consumo, bem como na produção de leite de cabra para consumo humano e para a produção de queijos e doces (SADER, 2023).

A produção de caprinos está concentrada principalmente nas zonas áridas e semiáridas, que representam 60 % do país. Oitenta por cento da produção de caprinos ocorre no sistema extensivo, devido a seus baixos custos de produção, com o uso de grandes áreas áridas de arbustos e gramíneas. As limitações enfrentadas são grandes defasagens tecnológicas e sérios problemas sanitários (Cuéllar *et al.*, 2012). Dependendo do produto final, há três modelos de produção: cabras em aleitamento com peso de 8 a 10 kg, cabras engordadas com peso de 40 a 45 kg e para produção de leite (Andrade-Montemayor, 2017).

Embora haja pouca informação sobre a saúde dos caprinos, sabe-se que as doenças respiratórias são importantes no México, mas os programas de diagnóstico e prevenção raramente são realizados (Cuéllar *et al.*, 2012). Esses problemas são resolvidos temporariamente com a aplicação de tratamentos com antibióticos de amplo espectro, o que pode levar posteriormente à resistência bacteriana. Diversos fatores estão envolvidos no desenvolvimento do Complexo Respiratório Infeccioso de Ruminantes (CRIR), como o ambiente, as condições do animal e a presença de agentes infecciosos, como vírus e bactérias (Laishevtsev, 2020; Rahal *et al.*, 2014).

Mannheimia haemolytica e *Pasteurella multocida* são as bactérias frequentemente envolvidas em doenças respiratórias e são consideradas as bactérias mais importantes, afetando cabras de todas as idades, com ampla distribuição, ocorrendo em climas temperados, subtropicais e tropicais (Rawat *et al.*, 2019; Amin, 2020). Observou-se que a *P. multocida* e a *M. haemolytica* são responsáveis por surtos com apresentação septicêmica ou pneumônica, causando a morte de cabritos lactantes expostos à fadiga e ao resfriamento (Hakim *et al.*, 2014). Ambos os microrganismos fazem parte da microbiota normal do trato respiratório e da orofaringe de ruminantes, mantendo uma relação simbiótica com seu hospedeiro (Hakim *et al.*, 2014; Laishevtsev, 2020).

A cápsula da *M. haemolytica* lhe confere a propriedade de aderência (Laishevtsev, 2020; Wilson & Ho, 2013). Além da cápsula, há outros fatores de virulência na *M. haemolytica*, um deles é a leucotoxina, que é uma citolisina formadora de poros que destrói leucócitos de ruminantes; é uma exotoxina de 104 kDa produzida durante a fase logarítmica do crescimento bacteriano. A síntese, a ativação e a produção de leucotoxina são reguladas por meio de um operon policistrônico, que contém os genes *lktC*, *lktA*, *lktB* e *lktD* (Oppermann *et al.*, 2017; Laishevtsev, 2020).



O sequenciamento do gene *sodA* foi usado para a identificação de *Mannheimia* spp. (Aulik *et al.*, 2010; Nefedchenkoa *et al.*, 2016). Com relação à *P. multocida*, ela tem cinco sorogrupos capsulares denominados: A, B, D, E e F (Wilson & Ho, 2013); poucos estudos foram realizados no México com essa espécie animal, mas a presença dos sorogrupos A e D foi relatada (Blanco *et al.*, 1993). O objetivo do presente estudo foi caracterizar e determinar a presença de *M. haemolytica* e *P. multocida* isoladas de crianças com problemas respiratórios no México.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Uma amostra de conveniência não probabilística (Hernández, 2021) foi coletada durante um ano de crianças com problemas respiratórios que apresentavam secreção nasal e ocular, tosse, estertores na ausculta torácica, depressão e febre. Um total de 1.498 amostras foi obtido nos estados de San Luis Potosí (707), Baja California Sur (363), Coahuila (211), Puebla (148), Durango (35), Guerrero (20), Guanajuato (9) e Querétaro (5). Os exsudatos nasais foram coletados usando cotonetes com meio de transporte Ames com carvão ativado. Os foram mantidos refrigerados a 4 °C até o estudo bacteriológico no laboratório.

Isolamento bacteriológico e identificação bacteriana

O estudo bacteriológico dos cotonetes nasais obtidos foi realizado em placas de ágar sangue e ágar Mc Conkey, incubadas a 37 °C por 24 horas. A identificação do gênero e da espécie dos isolados foi realizada de acordo com a morfologia colonial e microscópica, coloração de Gram, fermentação de açúcar, produção de H₂S, indol, urease e oxidase (Legesse *et al.*, 2018).

Extração de DNA

A extração de DNA de isolados bacterianos foi realizada usando a técnica de tiocianato de guanidina (Pitcher *et al.*, 1989). A concentração de DNA foi quantificada por espectrofotometria (espectrofotômetro SmartSpec-Plus BIORAD Laboratories, EUA) a uma absorbância de 260/280. Para os isolados identificados como *Mannheimia*, a espécie foi determinada por PCR em tempo real, identificando o gene *sodA*, usando o par de primers projetado por Guenther *et al.*, (2008). As cepas identificadas como *M. haemolytica* foram testadas quanto à presença do gene *IktA* por PCR (Tabela 1).

PCR multiplex para detecção de genes de virulência associados a *P. multocida*

Os isolados identificados por bacteriologia como *P. multocida* foram submetidos a PCR multiplex para gênero usando a sequência do gene *KMT1*, para o biótipo das cepas, a presença dos genes *hyaD-hyaC* que codificam o tipo capsular A e o gene *dcbF* para identificar o tipo D foi identificado (Rawat *et al.*, 2019).



Determinação dos sorotipos somáticos de *P. multocida*

O sorotipo somático de *P. multocida* foi determinado por precipitação em gel com antissoros específicos (Chengappa *et al.*, 1982).

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos usadas para *P. multocida* e *M. haemolytica*

Gen	Iniciadores	Sequência 5' a 3'	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>M. haemolytica</i>	<i>sodA</i>	SODA-FWD SADA-REV	AGCAGCGACTACTCGTGTGGTTTCAG AAGACTAAAATCGGATAGCCTGAAACGCCTG	143 Guenther 2008
	<i>lktA</i>	LKTA-FWD LKTA-REV	GGTGAAGGTTACGACCGAGTT CTTCACGGTTGCCCACTAATG	172 Este estudo
<i>P. multocida</i>	<i>KMT1</i>	KMT1T7 KMT1SP6	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460 Rawat <i>et al.</i> , 2009
	<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA-FWD CAPA-REV	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCTAGTG	1044 Townsend <i>et al.</i> , 2001
	<i>dcbF</i>	CAPD-FWD CAPD-REV	TTACAAAAGAAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657 Townsend <i>et al.</i> , 2001

RESULTADOS

Isolados bacterianos de cotonetes nasais

Dos 1.498 cotonetes de exsudato nasal que foram submetidos a estudo bacteriológico, foram obtidos 535 isolados de bactérias da família *Pasteurellaceae*, com uma taxa de recuperação de 36 %, dos quais 92 % (491/535) foram identificados como *M. haemolytica* e 8 % (44/535) como *P. multocida*. A distribuição dos isolados obtidos em cada um dos estados da República Mexicana onde a amostragem foi realizada é apresentada na Tabela 2.

Caracterização molecular da *M. haemolytica*

Dos 491 isolados identificados bioquimicamente como *M. haemolytica*, 50 foram selecionados aleatoriamente para caracterização por PCR em tempo real e técnicas de PCR de ponto final, classificados por PCR em tempo real para localizar o gene *sodA*, obtendo amplificação em 46 isolados, que foram confirmados como *M. haemolytica*. Os 46 isolados confirmados por PCR como *M. haemolytica* foram submetidos a PCR de ponto final para amplificar um segmento de 172 pb do gene *lktA*; 39 isolados apresentaram amplificação positiva.



Tabela 2. Isolados obtidos de crianças com problemas respiratórios nos estados da República Mexicana onde as amostras foram coletadas

Estado	Número de amostras	Isolamentos positivos	
		<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
San Luis Potosí	707	231 (47.1 %)	4 (9.1 %)
Baja California Sur	363	113 (23 %)	9 (20.4 %)
Coahuila	211	86 (17.5 %)	16 (36.4 %)
Puebla	148	34 (6.9 %)	11 (25 %)
Durango	35	10 (2 %)	1 (2.3 %)
Guerrero	20	16 (3.3 %)	1 (2.3 %)
Guanajuato	9	0	2 (22 %)
Querétaro	5	1 (0.2 %)	0
Total	1498	491 (12.8)	44 (2.9)

Determinação do tipo capsular de *P. multocida*

Os 44 isolados identificados por testes bioquímicos como *P. multocida*, quando testados simultaneamente para o gene *kmt* para confirmar o gênero e os genes *hyaD-hyaC* para determinar o tipo capsular A, amplificaram um segmento de 460 pb, o que indicou e confirmou que todos eles pertencem ao gênero *Pasteurella*. Com relação ao tipo capsular, 36 isolados amplificaram um segmento de 1044 pb, caracterizando-se, portanto, como pertencentes ao tipo capsular A. Os oito isolados restantes, quando testados para o tipo D, amplificaram uma banda de 657 pb correspondente à presença do gene *dcbF*, que determina sua pertença ao biótipo capsular D (Figura 2).

Sorotipos somáticos de *P. multocida*

Os oito isolados confirmados como *P. multocida* tipo D, após IDD, apresentaram uma banda de precipitação para o sorotipo 3, confirmando que esses isolados obtidos de cotonetes nasais de crianças pertenciam ao tipo D:3. As cepas de referência de *P. multocida* dos sorotipos D:3, A:3 e A:1 foram usadas nesse teste.



DISCUSSÃO

As informações relacionadas a problemas respiratórios em caprinos são escassas no México e até mesmo no continente americano, talvez porque essa espécie animal não seja considerada economicamente importante. A literatura sobre esse assunto geralmente é gerada em países de outros continentes.

No México, temos o antecedente de um estudo realizado por [Blanco et al., \(1993\)](#), no qual foram determinados os tipos capsulares e somáticos de *P. multocida* e os sorotipos de *P. haemolytica* (atualmente *M. haemolytica*), isolados de 148 pulmões com lesões inflamatórias de ovinos e caprinos coletados no matadouro, obtendo-se 79 isolados de bactérias da família *Pasteurellaceae*, 30 dos quais corresponderam a *M. haemolytica* e 49 a *P. multocida*. Na tipagem, especificamente dois isolados de *M. haemolytica* de caprinos corresponderam ao sorotipo A, e dos três isolados de *P. multocida*, um correspondeu ao tipo A e dois ao tipo D. É importante mencionar que, neste estudo, não foram utilizadas metodologias moleculares para a identificação bacteriana nem para a determinação dos tipos capsulares, sendo usados apenas testes convencionais, como hemaglutinação indireta, decapsulação de hialuronidase e floculação de acriflavina. Uma diferença importante é a proporção de isolados, pois [Blanco et al., \(1993\)](#), obtiveram um número maior de isolados de *P. multocida* do que de *M. haemolytica*, em contraste com o presente estudo.

A diferença pode se dever a vários fatores, como a origem geográfica e o tipo de amostras, já que [Blanco et al., \(1993\)](#) coletaram amostras de tecido pulmonar com lesões de animais adultos da parte central do país, principalmente dos estados do México, Queretaro, Jalisco, Guanajuato e Aguascalientes, ao contrário do presente estudo, no qual o exsudato nasal foi coletado principalmente de crianças doentes em San Luis Potosi, Baja California Sur, Coahuila e Puebla; entretanto, uma revisão da literatura encontrou resultados variáveis. Por exemplo, na Etiópia, um estudo bacteriológico foi realizado em 112 pulmões de cabras com lesões pneumônicas, dos quais foram obtidos 21 isolados de *M. haemolytica* e seis de *P. multocida*, nos quais não foram usadas técnicas moleculares para identificação, nem foi realizada a tipagem dos isolados ([Demissie et al., 2014](#)). Outro estudo semelhante foi realizado no Sudão, onde, de 200 pulmões de cabras com lesões pneumônicas, foram obtidos 102 isolados de diferentes bactérias, predominantemente *M. haemolytica* com 85 isolados, seguido por *Corynebacterium pseudotuberculosis* com sete isolados, *Streptococcus* spp α hemolítico com cinco e *P. multocida* com um isolado, concluindo assim que a *M. haemolytica* sorotipo A é a principal causa de problemas respiratórios em cabras nessa região do Sudão ([Elsheikh et al., 2012](#)). Em outra pesquisa, realizada na Índia, foram coletadas amostras de cabras afetadas por problemas respiratórios, obtendo-se 20 cotonetes nasais, dos quais foram recuperados 15 isolados de *M. haemolytica*, dois de *Staphylococcus* spp, dois de *Proteus* spp, e um de *E. coli*, além disso, realizaram um estudo bacteriológico de cinco lavagens traqueais de cabras, das quais foram obtidos quatro isolados de *M. haemolytica* e um de *E. coli*, de modo que os autores concluem que, nessa região da Índia, o principal agente etiológico envolvido em surtos de doenças respiratórias em cabras é a *M. haemolytica* ([Ponnusamy et al., 2017](#)).



Uma situação diferente é apresentada nos resultados encontrados em um estudo realizado no Irã, no qual ovelhas e cabras foram amostradas com cotonetes de cavidades nasais e amígdalas (Sahragard *et al.*, 2012), encontrando 26 isolados de *P. multocida* e caracterizando-os com uma PCR multiplex, eles descobriram que 24 deles eram do tipo A e dois pertenciam ao tipo D, embora não se refiram especificamente a quantos isolados correspondem a ovelhas e quantos a cabras (Tahamtan *et al.*, 2016). É importante ressaltar que, nesse estudo, eles testaram alguns genes de virulência relacionados à produção de toxinas e proteínas da membrana externa. Em outro estudo realizado no Egito (Amin, 2020) com 20 cabras que sofriam de pneumonia, a PCR do tecido pulmonar foi 95 % positiva para *Pasteurella multocida* como o único agente bacteriano envolvido no problema respiratório.

Dos 50 isolados selecionados para identificação definitiva por PCR, 46 apresentaram a presença do gene *sodA*, confirmando sua identificação definitiva como *M. haemolytica*; os 4 isolados restantes foram negativos e, portanto, não foram considerados para o presente estudo. A identificação bacteriana inicial foi realizada usando características fenotípicas e metabólicas que não são necessariamente altamente específicas, o que pode levar à coleta de informações que não coincidem quando comparadas com informações genotípicas obtidas com ferramentas moleculares.

Com relação ao estudo para determinar a presença do gene *lktA* nos 46 isolados de *M. haemolytica*, verificou-se que 39 (84.7 %) amplificaram um segmento do gene e os 7 (15.3 %) restantes não amplificaram. Vougidou *et al.*, (2013) estudaram 11 isolados de caprinos e 70 de ovinos; 100 % das cepas mostraram a presença do gene *lktA*, porém, em outros estudos, Fisher *et al.*, (1999) relataram que ao estudar 147 cepas de *Mannheimia haemolytica* e 101 de *Pasteurella trehalosi*, o gene *lktA* foi detectado em 108 (43.5 %) isolados e 140 (56.5 %) foram negativos, os autores não especificam a porcentagem por gênero bacteriano. Em outro estudo, Kelley *et al.*, (2007), analisaram 48 cepas obtidas de ovelhas selvagens e descobriram que 20 (41.6%) isolados tinham o gene *lktA* e 28 (58 %) não o tinham.

A razão pela qual alguns isolados de *M. haemolytica* têm o gene *lktA* e outros não é explicada por Davies *et al.*, (2001) quando mencionam que alguns genes diretamente envolvidos na patogênese são transferidos entre espécies bacterianas por bacteriófagos e os genes do operon da leucotoxina parecem ser transferidos horizontalmente entre cepas de *M. haemolytica* e até mesmo entre *M. glucosida* e *P. trehalosi*.

De acordo com a bibliografia consultada, pode-se observar que, em geral, há pouca informação relacionada a estudos de problemas respiratórios em caprinos, pois a maioria dos estudos os descreve como “realizados em ovinos e caprinos” ou simplesmente “realizados em pequenos ruminantes” e, ao apresentar os resultados, não mencionam claramente a separação por espécie animal, o que contribui para o fato de haver pouca informação específica sobre o assunto em caprinos.



CONCLUSÃO

O que pode ser destacado dos estudos realizados sobre problemas respiratórios em caprinos, bem como em ruminantes em geral, é que a frequência dos principais agentes etiológicos, como *M. haemolytica* e *P. multocida*, difere de acordo com a região geográfica, por isso é necessário realizar esse tipo de estudo, pois eles contribuem com informações que têm aplicação prática no diagnóstico, nos fatores de virulência e na formulação de produtos biológicos específicos para a região. Um aspecto que não deve ser omitido em estudos futuros é o relacionado à resistência bacteriana a quimioterápicos, pois atualmente ela tem um impacto importante na saúde pública e animal.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo projeto: “Estudio epidemiológico de enfermedades que afectan la producción caprina en México”, SAGARPA-CONACYT 48599 e pela subvenção concedida pelo Fundo Setorial para Pesquisa em Agricultura, Pecuária, Aquicultura, Agrobiotecnología e Recursos genéticos vegetais-CONACYT.

LITERATURA CITADA

AMIN A. 2020. Pathological investigation on natural infection by *Pasteurella multocida* in goats. *Journal of advanced veterinary research*. 10(2):88-95.
<https://advetresearch.com/index.php/AVR/article/view/440>

ANDRADE-Montemayor HM. 2017. Producción de caprino en México. *Tierras Caprino*. (18):28-31. Fundación Dialnet. España. <https://www.ces.ncsu.edu/wp-content/uploads/2017/07/Produccio%CC%81n-de-Caprino-en-Me%CC%81xico.pdf?fwd=no>

AULIK NA, Hellenbrand, KM, Klos H, Czuprynski CJ. 2010. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils. *Infection and immunity*. 78(11):4454–4466. <https://doi.org/10.1128/IAI.00840-10>

BLANCO VFJ, Trigo TFJ, Jaramillo ML, Aguilar RF, Tapia PG, Suárez GF. 1993. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Veterinaria México*. 24(2):107-112.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=12525>

CHENGAPPA MM, Myers RC, Carter GR. 1982. Capsular and Somatic Types of *Pasteurella multocida* from Rabbits. *Revue canadienne de medecine comparee*. 46(4):437-439. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6816462/>

CUÉLLAR OJA, Tórtora PJ, Trejo GA, Román RP. 2012. La producción caprina mexicana. Particularidades y complejidades. Ed. Ariadna. Primera Edición. DF, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

https://www.researchgate.net/publication/317702019_La_produccion_caprina_mexicana_Particularidades_y_complejidades



DAVIES RL, Whittam TS, Selander RK. 2001. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (*lktA*) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Journal of bacteriology*. 183(4):1394–1404. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1394-1404.2001>

DEMISSIE T, Dawo F, Sisay T. 2014. Biochemical and antigenic characterization of *Mannheimia*, *pasteurella* and *Mycoplasma* species from naturally infected pneumonic sheep and goats, Bishoftu, Ethiopia. *African journal of basic & applied sciences*. 6(6):198-204. ISSN: 2079-2034.

https://www.researchgate.net/publication/272174270_Biochemical_and_Antigenic_Characterization_of_Mannheimia_pasteurella_andMycoplasma_Species_from_Naturally_Infected_Pneumonic_Sheep_and_Goats_Bishoftu_Ethiopia

ELSHEIKH HM, Hassan SO. 2012. Pneumonia in Goats in Sudan. *International journal of animal and veterinary advances*. 4(2):144-145. 2012 ISSN: 2041-2908.

<https://maxwellsci.com/print/ijava/v4-144-145.pdf>

FISHER MA, Weiser GC, Hunter DL, Ward AC. 1999. Use of a polymerase chain reaction method to detect the leukotoxin gene *lktA* in biogroup and biovariant isolates of *Pasteurella haemolytica* and *P. trehalosi*. *American journal of veterinary research*. 60(11):1402–1406. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10566816/>

GUENTHER S, Schierack P, Grobbel M, Lübke-Becker, A, Lothar HW, Ewers C. 2008. Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. *Journal of microbiological methods*. 75(1):75–80. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.008>

HAKIM AS, Bakry MA, Ata NSS, Zaki MS. 2014. Role of molecular techniques in characterization of bacteria causing pneumonia in small ruminants. *Life science journal*. 11(6):147-153.

https://www.researchgate.net/publication/286834882_Role_of_molecular_techniques_in_characterization_of_bacteria_causing_pneumonia_in_small_ruminants

HERNÁNDEZ GO. 2021. Aproximación a los distintos tipos de muestreo no probabilístico que existen. *Revista cubana de medicina general integral*. 37(3):1-3.

<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=110056>

KELLEY ST, Cassirer EF, Weiser GC, Safaee S. 2007. Phylogenetic diversity of *Pasteurellaceae* and horizontal gene transfer of leukotoxin in wild and domestic sheep. *Infection, genetics and evolution*. 7(1):13–23.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.03.005>

LAISHEVTSEV AI. 2020. Mannheimiosis of cattle, sheep and goats. *IOP Conf. Ser. Earth and Environmental Sciences*. 548 072038. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/548/7/072038>

LEGESSE A, Abayneh T, Mamo G. Gelaye E, Tesfaw L, Yami M, Belay A. 2018. Molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* isolates associated with pneumonic cases of sheep in selected areas of Central Ethiopia. *BMC microbiology*. 18: 205. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1338-x>



NEFEDCHENKOA AV, Shikovb AN, Glotova AG, Glotovaa TIV, Ternovoyb A, Agafonovb AP, Sergeevb AN, and Donchenkoa NA. 2016. Development of a method for Identification and genotyping of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* bacteria using polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of bacterial cultures isolated from cattle. *Molecular genetics, microbiology and virology*. 31(2):75–81. <https://www.researchgate.net/publication/308163117>

OPPERMANN T, Busse N, Czermak P. 2017. *Mannheimia haemolytica* growth and leukotoxin production for vaccine manufacturing — A bioprocess review. *Electronic journal of biotechnology*. 28:95-100. ISSN 0717-3458. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.06.001>

PITCHER DG, Saunders NA, Slown RJ. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in applied microbiology*. 8(4):151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>

PONNUSAMY P, Masilamoni BS, Ranjith KM, Manickam R. 2017. Isolation, identification and antibiogram of *Mannheimia hemolytica* associated with caprine pneumonia in the Cauvery Delta Region of Tamil Nadu, India. *International journal of current microbiology and applied sciences*. 6(9):3118-3122. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.385>

RAHAL A, Ahmad AH, Prakash A, Mandil R, Kumar AT. 2014. Environmental attributes to respiratory diseases of small ruminants. *Veterinary medicine international*. 853627. <https://doi.org/10.1155/2014/853627>

RAWAT N, Gilhare VR, Kushwaha KK, Hattimare DD, Khan FF, Shende RK, Jolhe DK. 2019. Isolation and molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* associated with pneumonia of goats in Chhattisgarh. *Veterinary world*. 12(2): 331-336. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.331-336>

SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). La caprinocultura en México. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-caprinocultura-en-mexico>

SAHRAGARD I, Tahamtan Y, Valadan M, Hyati M, Moazeni F, Shirazi Z. 2012. Development of rapid PCR method for simultaneous identification of species, specific capsular type, and toxigenicity of *Pasteurella sp.* isolates. *Comparative clinical pathology*. 21:333-1336. <https://doi.org/10.1007/s00580-011-1291-7>

TAHAMTAN Y, Mirghafari H. 2016. Classification, capsular PCR typing and genetic diversity of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and goats in Iran using Bam HI, Hind III restriction endonuclease enzymes by PCR-RFLP. *Tropical biomedicine*. 33(3):535–542. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33579127/>

TOWNSEND KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of clinical microbiology*. 39(3):924-929. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.924-929.2001>



VOUGIDOU C, Sandalakis V, Psaroulaki A, Petridou E, Ekateriniadou L, 2013. Sequence diversity of the leukotoxin (*lktA*) gene in caprine and ovine strains of *Mannheimia haemolytica*. *The Veterinary record*. 172(16):424.

<https://doi.org/10.1136/vr.101014>

WILSON BA, Ho M. 2013. *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology. *Clinical microbiology reviews*. 26(3): 631–655.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00024-13>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>