



Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control

Bovine mannheimiosis: etiology, prevention and control

Carlos Julio Jaramillo-Arango* Francisco J. Trigo Tavera** Francisco Suárez-Güemes***

Abstract

Mannheimia haemolytica (Mh) is the most pathogenic bacteria associated with bovine pneumonic pasteurellosis (mannheimiosis); furthermore, it is the most important economic loss disease in beef cattle, and the second one after gastrointestinal diseases mainly in less than a year old dairy heifers. It is a common and important opportunistic agent in bovine nasopharynx. Stress immunosuppression or the infection caused by respiratory viruses or *Mycoplasma* spp, lead to its establishment and multiplication in lung tissue. A1 and A6 are the most frequent serotypes in pneumonic injuries, and A1 and A2 in the nasopharynx of healthy bovine. Among the Mh virulence factors, leukotoxin is the most important one; its primarily toxic effect is primarily against leukocytes in ruminants. A better understanding of the epidemiology and the importance of Mh species requires new identification criteria that include molecular techniques, as well as more sensitive procedures regarding biochemical and immunological isolation and identification. Antimicrobial efficacy, as prophylactic or therapeutical agents, has been very variable due to diagnosis inaccuracies and to the increase of multi-resistant strains. There is a varied range of bacterins that have been used over the last decades; the efficacy of many of them has been questioned as they only protect partially and some of them might even increase the morbidity. Vaccines with a supernatant culture containing leukotoxin and other soluble antigens, or isolated bacterial extracts or combined with bacterins, have been recently developed showing satisfactory results. Efficient prevention and control of bovine mannheimiosis should be supported by a reliable diagnosis, use of vaccines and efficient therapeutic measurements, together with good management practices.

Key words: BOVINE MANNHEIMIOSIS, ETIOLOGY, PREVENTION AND CONTROL, BOVINES.

Resumen

Mannheimia haemolytica (Mh) es la bacteria más patógena y más comúnmente asociada con la pasteurelosis neumónica (mannheimiosis) bovina, la enfermedad económicamente más importante en bovinos productores de carne, y la segunda, después de las enfermedades gastrointestinales, en becerras lecheras, principalmente menores de un año. Es un habitante normal y un importante agente oportunista de la nasofaringe de bovinos; la inmunosupresión por estrés o la infección por virus respiratorios o por *Mycoplasma* spp, propician su establecimiento y multiplicación en el tejido pulmonar. El A1 y el A6 son los serotipos más frecuentes en lesiones neumónicas, y el A1 y A2 en nasofaringe de bovinos sanos. Entre los factores de virulencia de Mh, la leucotoxina es el más importante, cuyo efecto tóxico primario es en contra de los leucocitos, particularmente de rumiantes. Para comprender mejor la epidemiología y la importancia de las especies de Mh, se requieren nuevos criterios para su identificación, que incluyan técnicas moleculares y procedimientos más sensibles de aislamiento e identificación bioquímica e inmunológica. La eficacia de los antimicrobianos, como profilácticos o terapéuticos, ha sido muy variable debido a inconsistencias en el diagnóstico y al incremento en la frecuencia de cepas multiresistentes. Existe una amplia gama de bacterinas empleadas durante décadas; sin embargo, la eficacia de muchas de ellas ha sido cuestionada, pues sólo protegen parcialmente, incluso algunas pueden incrementar la morbilidad. Recientemente se han desarrollado vacunas con sobrenadante de cultivo que contienen leucotoxina y otros antígenos solubles, o extractos bacterianos solos o combinados con bacterinas, con resultados muy satisfactorios. La prevención y el control eficaz de la mannheimiosis bovina deben sustentarse en un diagnóstico confiable, vacunas y medidas terapéuticas eficaces, y buenas prácticas de manejo.

Palabras clave: MANNHEIMIOSIS BOVINA, ETIOLOGÍA, PREVENCIÓN Y CONTROL, BOVINOS.

Recibido el 28 de julio de 2008 y aceptado el 9 de enero de 2009.

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

**Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

***Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Correspondencia: Carlos Julio Jaramillo-Arango, correo electrónico: cija@servidor.unam.mx

Introduction

Among the infectious diseases affecting cattle, the respiratory ones constitute the worldwide main economical loss cause; this is especially evident in young animals.¹ Approximately 25% of the heifers are infected by at least an episode of a respiratory disease during their first year of life with rates going from 14% to 38%; this incidence is higher in male heifers than in female ones during the stage previous to weaning, and also during the fattening periods. Furthermore, it is estimated that pneumonias cause approximately 75% of the clinical cases, and a mortality of 45 to 55%. Its treatment could represent 8% of the production costs.²

Pasteurella are the most isolated microorganisms from pneumonic processes in domestic animals; these cause the most significant disease called bovine pneumonic pasteurellosis (BPP or mannheimiosis), which is also called shipping fever. This respiratory disease is generally fatal, and is characterized by a serious or severe fibrinous pleuropneumonia which principally affects recently transported less than one year old heifers, with a higher incidence in one to five month old ones born during the fall or winter.³⁻⁶

BPP is one of the most expensive diseases affecting dairy or beef cattle, and especially in those animals which have been recently included within the herd. It is considered the most economically important disease in beef cattle, and the second one after gastrointestinal diseases in lactating heifers;⁷ therefore, it is one of the main loss causes in the worldwide bovine cattle industry. It is calculated that it represents 30% of total mortality in bovines, and at least 1% in fattening cattle industries. Moreover, it is related with an annual economical loss of over a billion dollars just in North America.^{3,6,8-10} It is also responsible for the morbidity and gaining weight loss in at least an additional 10% in these cattle industries; consequently, costs due to the disease in the cattle industry in the United States of America are at least of 640 million dollars per year.⁹ This disease is one of the main morbidity and mortality causes in dairy heifers in that country and Canada, with outbreaks that can affect 80 to 90% of the animals with lethal rates less than 5%.⁵

Considering that *Mannheimia haemolytica* is the main bacterial pathogen of BPP, and to fulfill the purposes of this article, the term bovine mannheimiosis will be used along the text.

Etiology

Etiology of bovine mannheimiosis (BMn) is multifactorial, and diverse risk factors determine the presentation and seriousness or severity of the pneumonic

Introducción

Entre las enfermedades infecciosas que afectan al ganado bovino, las de origen respiratorio constituyen la principal causa de pérdidas en el ámbito mundial, especialmente en animales jóvenes.¹ Se calcula que aproximadamente 25% de los becerros experimentan al menos un episodio de enfermedad respiratoria durante el primer año de vida, con tasas que van de 14 a 38%; estas incidencias son mayores en los becerros machos que en las hembras, tanto en la etapa previa al destete como en los periodos de engorda; además, se estima que las neumonías causan aproximadamente 75% de los casos clínicos, y provocan de 45% a 55% de la mortalidad; su tratamiento llega a representar 8% del total de los costos de producción.²

Los microorganismos del género *Pasteurella* constituyen las bacterias más frecuentemente aisladas de los procesos neumónicos de los animales domésticos; entre los cuales el problema de mayor significación es la pasteurellosis neumónica bovina (PNB), también llamada neumonía por fiebre de embarque; enfermedad respiratoria generalmente fatal que se caracteriza por una pleuroneumonía fibrinosa grave, y que afecta principalmente a animales menores de un año recientemente transportados, con una mayor incidencia en becerros de 1 a 5 meses de edad nacidos durante otoño e invierno.³⁻⁶

La PNB es una de las enfermedades más costosas que afecta al ganado bovino productor de leche o productor de carne, especialmente en aquellos animales de reciente ingreso en el hato; se considera la enfermedad económicamente más importante en bovinos productores de carne y la segunda, después de las enfermedades gastrointestinales, en becerras lecheras,⁷ por lo que es una de las principales causas de pérdidas en la industria ganadera bovina del mundo; se calcula que representa 30% de la mortalidad total en bovinos, y al menos 1% en las ganaderías de engorda, y está relacionada con pérdidas económicas por más de mil millones de pesos anuales tan sólo en Norteamérica.^{3,6,8-10} Además, es responsable de la morbilidad y pérdidas por ganancia de peso en al menos 10% adicional de estas ganaderías; consecuentemente, los costos por la enfermedad en la industria ganadera de Estados Unidos de América son de, al menos, 640 millones de dólares anuales.⁹ Esta enfermedad es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en becerras lecheras en ese país y Canadá, con brotes que llegan a afectar entre 80% y 90% de los animales, con tasas de letalidad menores a 5%.⁵

Considerando que *Mannheimia haemolytica* es el principal patógeno bacteriano de la PNB, para los propósitos de este artículo se nombrará a esta última

lesions. Among these factors, those which outstand are the ones related with management as they generate stress, harsh temperature changes, overcrowding, transport, confinement of animals at different age, condition at weaning and calostrum immunoglobulin level, among others. In addition, other bacterial origin primary infectious agents intervene, and particularly, viral origin primary agents such as the syncytial virus, parainfluenza virus, 3 infectious bovine rhinotracheitis (herpes virus 1) and, occasionally, adenovirus.^{4,5,10,11} These viruses cause a direct cytopathic effect on the respiratory apparatus; furthermore, they decrease the bacterial removal and phagocytic capability of the alveolar macrophage, which facilitates the lung colonization by *Pasteurella* spp.¹¹

Pasteurella genus species are habitual hosts of the superior respiratory tract in domestic and wild ruminants, although *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* and *P. multocida* are very frequently found to be associated with respiratory diseases. There are variations within different strains regarding their capability to cause diseases in different host animals.^{9,12}

P. multocida has been identified as an important pathogenic agent in animals for several years. Nevertheless, the frequency and significance of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* as a potential pathogenic agent has been widely recognized in the last years, and many studies on viral diseases have demonstrated that *P. multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* perform more frequently as secondary invaders rather than being the primary cause of disease.¹³

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica is the most pathogenic bacterium and more commonly associated with the respiratory disease complex in bovines, particularly with BMn.^{6,8,10,14} It is a normal inhabitant in healthy bovine tonsil crypts, and besides, an important opportunistic agent of the respiratory tract due to its colonization capability in the upper part of it, and under certain conditions, causing immunosuppression of the host affecting its defense mechanisms, permitting that bacteria can establish and rapidly multiply, penetrating into the lungs during inhalation and start an active infection of the alveolar epithelium.¹⁰

This bacterium has been submitted to an extensive re-classification; it was originally called *Bacterium bipolare multocidum* by Theodore Kitt in 1885;^{2,9} later in 1896, Flugge re-named it *Bacillus bovisseptica*,⁹ and in 1932, Newson and Cross suggested the name of *Pasteurella haemolytica*.^{2,9,15} Between 1959 and 1961, Smith described two *P. haemolytica* biotypes according to phenotypic, epidemiologic and pathologic differences, and classified them in A and T due to their ability of the L-arabinose or trealose fermentation, respectively.^{2,9,15-18}

Biberstein *et al.*^{15,19} developed a serotyping

como manheimiosis bovina a lo largo de todo el texto.

Etiología

La etiología de la manheimiosis bovina (MnB) es multifactorial y se ven involucrados diversos factores de riesgo que determinan la presentación y severidad de las lesiones neumónicas; entre ellos destacan los relacionados con el manejo que generan estrés, como cambios bruscos de temperatura, hacinamiento, transporte, confinamiento de animales de diferentes edades, condiciones del destete, nivel de inmunoglobulinas en el calostro, entre otros; asimismo, intervienen otros agentes infecciosos de origen bacteriano y particularmente agentes primarios de tipo viral, tales como el virus sincitial, parainfluenza,³ rinotraqueítis infecciosa bovina (herpes virus 1) y, ocasionalmente, adenovirus.^{4,5,10,11} Estos virus causan efecto citopático directo en el aparato respiratorio; además, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar, lo cual facilita la colonización pulmonar por *Pasteurella* spp.¹¹

Las especies del género *Pasteurella* son comensales habituales del tracto respiratorio superior de los rumiantes domésticos y silvestres, y no obstante que *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* y *P. multocida* con mucha frecuencia se encuentran asociadas con enfermedades respiratorias, hay variaciones entre las diferentes cepas en su capacidad para producir enfermedad en los diferentes huéspedes animales.^{9,12}

P. multocida se ha identificado como un importante patógeno de los animales durante muchos años; sin embargo, la frecuencia y la significancia de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* como un patógeno potencial ha sido reconocida ampliamente en los últimos años, y numerosas investigaciones sobre enfermedades virales han demostrado que *P. multocida* y *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, actúan más frecuentemente como invasores secundarios que como causa primaria de enfermedad.¹³

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica es la bacteria más patógena y más comúnmente asociada con el complejo de las enfermedades respiratorias de los bovinos, particularmente con la MnB.^{6,8,10,14} La bacteria es un habitante normal de las criptas de las tonsilas del bovino sano y, además, un importante agente oportunista del tracto respiratorio debido a que usualmente coloniza la parte alta de éste y, bajo ciertas condiciones de inmunosupresión del huésped, afecta sus mecanismos de defensa, lo cual permite que la bacteria se establezca y se multiplique rápidamente, penetre a los pulmones durante la inhalación e inicie una infección activa del epitelio alveolar.¹⁰

system based on the indirect hemagglutination (IHA) of soluble capsular antigens in 1960, and in 1962, Biberstein and Gills²⁰ reported a consistent association between the serotypes and biotypes which establish a capsular serotyping. ^{15,16} In subsequent studies, the number of recognized serotypes increased to 17. ^{15,21} Serotypes 3, 4, 10 and 15 associated with biotype T and the rest with biotype A; non typifiable by IHA were later classified by counter-immunoelectrophoresis, demonstrating nine additional serotypes. ¹⁵

Through results obtained in studies on DNA-DNA hybridation in 1990, and according to biochemical properties and genetic analysis, serotypes T3, T4, T10 and T15, of biotype T, were re-classified as a separate species which was called *Pasteurella trehalosi*. ²² Younan and Fodor²³ reported the isolation of *P. haemolytica* serotype 17 (A17). Recently, *P. trehalosi* has been re-classified as *Bibersteinia trehalosi*. ²⁴

Mannheimia haemolytica

Pasteurella genus is built up by a wide group of bacteria species that interweave in their phenotypic and genotypic characteristics; therefore, since many years ago, studies have been performed in order to classify them adequately. The first studies of DNA-RNA hybridation demonstrated a homology of 8 to 24% between isolations of *P. haemolytica* and *P. trehalosi*. Years later, other studies validated these results with DNA-DNA hybridation and demonstrated a homology of 0-35% between *P. haemolytica* and *P. trehalosi*. ¹²

In 1999, through studies that included ribotyping, multilocus enzyme electrophoresis, 16S rRNA gene and DNA-DNA hybridation, *P. haemolytica* A serotypes were re-classified into the new *Mannheimia* genus. Consequently, previous serotypes A of *P. haemolytica* (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 and A17) were re-named as *Mannheimia haemolytica*. Serotype 11, which is not related with *Mannheimia haemolytica*, was re-named as Mg. ^{2,6,9,15}

According to the suggested classification by Angen *et al.*, ¹⁵ *Mannheimia* genus includes five species: *M. haemolytica* (Mh) (originally *P. haemolytica* biogroup 1) which includes serotypes A (1, 2, 5-9, 12-14, 16 and 17), all only isolated from ruminants and *M. granulomatis*, which includes previously classified strains as *P. granulomatis*, Bisgaard taxon 20 and *P. haemolytica* biogroup 3J. They also include all genetically classified strains such as *P. haemolytica*-like isolated from rabbits, hares and bovines, associated with pneumonias and purulent conjunctivitis in leporides together with skin granulomas and other diseases in bovines. *M. glucosida* includes originally classified strains as *P. haemolytica* biogroups 3 A-H and 9, as well as serotype 11 and all its related strains; the majority isolated from the nasal

Esta bacteria ha sido sometida a una extensa reclasificación; originalmente fue llamada *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt, en 1885; ^{2,9} posteriormente, en 1896, Flugge la renombra *Bacillus bovisseptica* ⁹ y, en 1932, Newson y Cross proponen el nombre de *Pasteurella haemolytica*. ^{2,9,15} Entre 1959 y 1961, Smith describe dos biotipos de *P. haemolytica* sobre la base de características fenotípicas y de diferencias epidemiológicas y patológicas, clasificándolos como A y T, según su habilidad para fermentar la L-arabinosa o la trealosa, respectivamente. ^{2,9,15-18}

Biberstein *et al.* ^{15,19} desarrollaron en 1960, un sistema de serotipificación basado en la hemoaglutinación indirecta (HAI) de antígenos capsulares solubles, y, en 1962, Biberstein y Gills²⁰ informaron sobre una asociación consistente entre los serotipos y los biotipos que establece una serotipificación capsular. ^{15,16} En investigaciones subsecuentes, el número de serotipos reconocidos aumentó a 17. ^{15,21} los serotipos 3, 4, 10 y 15 asociados con el biotipo T y el resto con el biotipo A; las cepas no tipificables por HAI fueron clasificadas posteriormente por contra-immunoelectroforesis, demostrándose nueve serogrupos adicionales. ¹⁵

En 1990, a partir de los resultados obtenidos en estudios sobre hibridación ADN-ADN, propiedades bioquímicas y análisis genéticos, los serotipos T3, T4, T10 y T15, del biotipo T, fueron reclasificados como una especie separada que se denominó *Pasteurella trehalosi*. ²² En 1995, Younan y Fodor²³ informaron sobre el aislamiento de *P. haemolytica* serotipo 17 (A17). Recientemente, *P. trehalosi* ha sido reclasificada como *Bibersteinia trehalosi*. ²⁴

Mannheimia haemolytica

El género *Pasteurella* está conformado por un amplio grupo de especies de bacterias que se entrecruzan en sus características fenotípicas y genotípicas, por lo que desde hace varios años se han realizado investigaciones con el propósito de clasificarlas adecuadamente. Los primeros estudios sobre hibridación del ADN-ARN demostraron una homología de 8% a 24% entre aislamientos de *P. haemolytica* y *P. trehalosi*; posteriores investigaciones validaron dichos resultados con estudios de hibridación de ADN-ADN, los cuales mostraron una homología de 0%-35% entre *P. haemolytica* y *P. trehalosi*. ¹²

En 1999, mediante estudios de ribotipificación, electroforesis de enzimas multi-locus, secuenciación del gene 16S del ARNr e hibridación ADN-ADN, los serotipos de *P. haemolytica* A fueron reclasificados en el nuevo género *Mannheimia*. En consecuencia, los anteriores serotipos A de *P. haemolytica* (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) fueron renombrados como *Mannheimia haemolytica*. El serotipo 11 restante,

cavity of sheep, in some cases these sheep presented pneumonia or other diseases. *M. ruminalis*, includes non hemolytic strains of *P. haemolytica*, previously described as *Actinobacillus lignieresii* and *P. haemolytica* biogroup 3J, isolated from bovine and ovine rumen, not associated with pathologic conditions. Lastly, *M. varigena*, includes a group of originally classified strains as *P. haemolytica* biogroup 6 and Bisgaard taxon 15 and 36 isolated from bovines and porcines, and associated with sepsis, pneumonia and other pathological conditions.^{2,9,15,25}

Mh is a Gram-negative bacterium, encapsulated, not dynamic, with a cocobacillar shape or small pleomorphic bacillus, (diameter of 1-3 µm), mesophilic, aerobic and facultative anaerobic, positive to oxidase and negative to indole; it ferments glucose and other carbohydrates, producing acid but not gas. It is negative to tests such as the metile red, gelatinase and Voges-Proskauer. It grows in MacConkey agar and enriched culture medium such as chocolate- or blood agar forming greyish-whitish smooth colonies with sizes that go from 1 to 2 mm in diameter after 24 hours of incubation. Most of the strains produce a β-haemolysis when they grow in bovine blood agar. It is capable to fermentate D-sorbitol, D-xylose, maltose and dextrin, but not arabinose or glucosides, and are negative to ornitine descarboxilase and NPG (β-glucosidase), but positive to ONPF (α-fucosidase). The presence of a capsule, which has antiphagocytic properties, makes it partially resistant to phagocytosis.^{15,18}

Mh can normally be isolated from pneumonic processes in bovines and ovines, and also from septicemic processes in sheep and from mastitis in ovines. Some of the serotypes probably constitute part of the microflora present in the ruminant upper respiratory tract, although its isolation is frequently difficult.^{4,15,18} There might be healthy carriers to the Mh strain which causes pneumonia in bovines and develops pneumonic pasteurellosis, or it might be possible that these strains are acquired from other animals.⁴

Mh is the main etiologic agent in the complex of respiratory diseases in bovines, particularly in MnB.^{5,11,25} It constitutes a new member to the Pasteurellaceae family that originally included *Haemophilus*, *Actinobacillus* and *Pasteurella* (HAP) genera. The majority of the members of the HAP family are hosts of mammals' mucosa, including human beings, birds and reptiles. Nevertheless, there are many pathogenic hosts which could cause a disease if conditions are appropriate.^{6,18}

From the 12 recognized serotypes of Mh, A1 and A2 are the most worldwide prevalent. These two serotypes are the ones most frequently isolated from calves.²⁶ A1 is the most frequently isolated one from pneumonic lesions in BMn cases, in spite of seroty-

que no está relacionado con *Mannheimia haemolytica*, se renombró como Mg.^{2,6,9,15}

Según la clasificación propuesta por Angen *et al.*,¹⁵ el género *Mannheimia* comprende cinco especies: *M. haemolytica* (Mh) (originalmente biogrupo 1) que incluye los serotipos A (1, 2, 5-9, 12-14, 16 y 17), todos aislados solamente de rumiantes. *M. granulomatis*, que incluye a cepas previamente clasificadas como *P. granulomatis*, Bisgaard taxón 20 y *P. haemolytica* biogrupos 3J. Incluye también todas las cepas clasificadas genéticamente como *P. haemolytica*-like (parecidas a *P. haemolytica*), aisladas de conejos, liebres y bovinos, asociadas con neumonías y conjuntivitis purulenta en lepóridos y con granulomas en piel y otras enfermedades en bovinos. *M. glucosida* incluye cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos 3 A-H y 9, así como al serotipo 11 y todas sus cepas, la mayoría aisladas de cavidad nasal de borregos, en algunos casos con neumonías u otras enfermedades. *M. ruminalis*, que incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii* y *P. haemolytica* biogrupos 3J, aisladas del rumen de bovinos y ovinos, no asociadas con estados patológicos. Por último, *M. varigena*, que comprende un grupo de cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos 6 y Bisgaard taxón 15 y 36, han sido aisladas de bovinos y porcinos, y asociadas con sepsis, neumonía y otros estados patológicos.^{2,9,15,25}

Mh es una bacteria gramnegativa, encapsulada, no móvil, de forma cocobacilar o de bacilo pequeño pleomórfico (1 a 3 µm de diámetro), mesofílica, aerobia y anaerobia facultativa, oxidasa positiva e indol-negativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas. Es negativa a las pruebas de rojo de metilo, gelatinasa, Voges-Proskauer. Crece en agar MacConkey, en medios enriquecidos como agar chocolate o agar sangre, formando colonias lisas de color blanco grisáceo, con tamaños de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 h de incubación. La mayoría de las cepas producen una β-hemólisis cuando crecen en agar con sangre de bovino. Es capaz de fermentar D-sorbitol, D-xilosa, maltosa y dextrina; no fermentan arabinosa o glucósidos, y son negativas a la ornitina descarboxilasa y NPG (β-glucosidasa), pero positivas a ONPF (α-fucosidasa). La presencia de cápsula con propiedades de superficie antifagocíticas la hacen parcialmente resistente a fagocitosis.^{15,18}

Mh se aísla normalmente de procesos neumónicos en bovinos y ovinos, y también de procesos septicémicos en borregos y de mastitis en ovejas. Algunos de los serotipos probablemente forman parte de la microflora residente del tracto respiratorio superior de los rumiantes, aunque con frecuencia es difícil su aislamiento.^{4,15,18} En bovinos que desarrollan pasteurellosis neumónica, probablemente haya portadores sanos de

pes A1 and A2 being more frequently found in the nasopharynx of healthy bovines.²⁷ Occasionally, serotypes A2, A5, A6, A7 and A9 are also isolated.^{2,5,6,8-10,28,29} Recent studies in Germany and in the United States of America revealed that besides the A1, the A6 has been recorded as the most frequently isolated one in bovine pneumonic lungs.^{30,31} Serotypes A11 (Mg) and A12 have also been recorded.^{2,32,33} Although, generally, only serotypes A1 and A2 are found in bovines, the latter is more frequently associated with pneumonic pasteurellosis in ovines than in bovines.^{8,28,34} These two serotypes are capable to colonize the upper respiratory tract in bovines and ovines, and are frequently species-specific regarding their capacity to affect the lower respiratory tract and cause a disease.^{2,9}

It is common that serotype A2 is present in the upper respiratory tract of healthy bovines, but after a stress status or a viral infection serotype A1 quickly replaces A2 and becomes the principal serotype; this might probably be due to a horizontal transmission from sick animals which have an active A1 in nasal discharges.^{2,9} It has been proven that serotype A2 predominated in bovine farm exudates and when these animals were taken to a pen auction and then to fattening pens A1 was the most predominant one. It is possible to isolate all serotypes in ovines.^{16,28} Several serologic studies suggest that it is possible that Mh inter-species transmission occurs from domestic animals towards wildlife or outdoor free life and vice-versa.³⁵

Non typificable (NT) Mh strains are also isolated with variable frequencies, sometimes high,¹⁷ which vary depending on the isolation source. A 9.3% has been recorded in nasal exudates in Great Britain and 12.8% in calves pneumonic lungs,²⁶ and in cows, 20.1% in nasal exudate, 16.2% in pneumonic lungs, 29.4% in blood, 25% in liver and spleen, 72.2% in the genital tract, 89.5% in udder and milk, 66.7% in the intestinal tract and 16.6% in the brain.³⁶ A 9.3% has been recorded in ovine nasal exudates in Mexico,³⁷ 15.8% in the United States of America³⁸ and 25% in Denmark,³⁹ and in pneumonic lungs, 3.6% in Ethiopia,⁴⁰ 7% in Hungary²¹ and 8.3% in Turkey.⁴¹

Higher frequencies to those lately recorded in other countries were found in recently performed studies in Mexico. Frequencies of 69% were found in healthy bovine's nasal exudates and 67% in sick animals,^{32,33} and a 71% in bovine pneumonic lungs.⁴²

These NT strains normally correspond to biotype A⁴³ and have been described as Mh mutants; in addition, some of them present soluble antigen production deficiencies.⁴⁴ In this sense, few studies quoted by Frank⁴³ mention the possibility that strains classified as NT by the indirect hemagglutination technique (IHA) are maybe serotypificable strains through this technique, but that its impossibility to react to the IHA

la cepa de Mh que causa la neumonía, o es posible que sean cepas adquiridas de otros animales.⁴

Mh es el principal agente etiológico en el complejo de las enfermedades respiratorias de los bovinos, particularmente de la MnB.^{5,11,25} Constituye un nuevo miembro de la familia Pasteurellaceae que originalmente incluía los géneros *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella* (HAP). La mayoría de los miembros de la familia HAP son comensales de la mucosa de mamíferos, incluyendo humanos, pájaros y reptiles, no obstante, muchos son patógenos oportunistas y pueden producir enfermedad bajo condiciones apropiadas.^{6,18}

De los 12 serotipos reconocidos de Mh, A1 y A2 son los más prevalentes en el mundo. Estos dos serotipos son los que con mayor frecuencia se aíslan de becerros;²⁶ el A1 es el que se aísla más frecuentemente de lesiones neumónicas en los casos de MnB, aun cuando en bovinos sanos son más frecuentes los serotipos A1 y A2 en la nasofaringe,²⁷ en ocasiones también se aíslan los serotipos A2, A5, A6, A7 y A9.^{2,5,6,8-10,28,29} En estudios recientes en Alemania y Estados Unidos de América, además del A1, el A6 ha sido registrado como el más frecuentemente aislado en pulmones neumónicos de bovinos.^{30,31} También se han registrado los serotipos A11 (Mg) y A12.^{2,32,33} No obstante que en los bovinos, por lo general, sólo se encuentran los serotipos A1 y A2, este último se asocia con la pasteurellosis neumónica más frecuentemente en ovinos que en bovinos.^{8,28,34} Estos dos serotipos son capaces de colonizar el tracto respiratorio superior de bovinos y ovinos y con frecuencia son especie-específicos en su capacidad de afectar el tracto respiratorio inferior y producir enfermedad.^{2,9}

En los bovinos sanos es común que el serotipo A2 esté presente en el tracto respiratorio superior, pero después de un estado de estrés o de una infección viral, el serotipo A1 rápidamente reemplaza al A2 como el serotipo principal; esto probablemente se deba a una transmisión horizontal a partir de animales enfermos que tengan el A1 activo en secreciones nasales.^{2,9} Se ha podido comprobar que el serotipo A2 predominaba en exudado de becerros en granja, y cuando estos animales fueron trasladados a corrales de subasta y luego a corrales de engorda se encontró que predominaba el A1. En los ovinos es posible aislar cualquiera de los serotipos.^{16,28} Diversos estudios serológicos sugieren que es posible que ocurra la transmisión interespecie de Mh desde animales domésticos hacia animales silvestres o de vida libre, o viceversa.³⁵

Cepas de Mh no tipificables (NT) también se aíslan con frecuencias variables, a veces altas,¹⁷ que varían dependiendo de la fuente de aislamiento. En Gran Bretaña se ha registrado 9.3% en exudado nasal y 12.8% en pulmones neumónicos de becerros,²⁶ y en vacas, 20.1% en exudado nasal, 16.2% en pulmones

can be a consequence to the loss of specific-serotype antigens in the cellular surface, which corroborates the difficulties that are present for Mh serotyping by IHA.

Pathogenicity mechanisms

Pathogenicity mechanisms of some of the members to the Pasteurellaceae family are not yet clearly defined, particularly the BPP pathogenesis, as some mechanisms which allow Mh to establish and disseminate during the infection are not satisfactorily elucidated, there is even the possibility that there are differences in those mechanisms between the isolated strains of several pneumonic cases, as well as strains coming from healthy animals.^{6,9,45}

In Mh strains that affect bovines, several expression mechanisms of their pathogenicity through potential antigens have been identified, these include: a leukotoxin (Lkt) with a specific activity against leukocytes, lipopolysaccharides (LPS), external membrane proteins (OMP), iron-regulated proteins (IRP), fimbria, enzymes (neuraminidase, protease and metaloglicoprotease), specific-serotype agglutinating antigens and adhesins, as well as the capsule and plasmids resistant to antimicrobials.^{6,8,14,46-48} All of these mechanisms play a fundamental role in the disease's pathogenesis; nevertheless, only Lkt is considered as the most important primary pathogenicity factor.^{10,14,45,46} All genes related with the identified virulence factors have been located in the Mh A1 genome, recently sequenced.⁴⁹

Leukotoxins (Lkt)

Lkt are a group of exotoxins which produce its primary toxic effect against leukocytes, particularly ruminant leukocytes, and specially against polymorphonuclear cells (PMN).^{10,48,50,51} The toxin originates a wide variety of biological effects on bovine leukocytes, and the final result is an acute fibrinous pleuropneumonia.^{10,50}

Studies in 1980¹⁸ revealed that the free supernatant of cultured Mh A1 cells could produce phagocytosis at low concentrations and was cytotoxic at high concentrations. Afterwards, it was discovered that the supernatant contained a thermolabile leukotoxin (Lkt) secreted by Mh during its exponential growth.^{9,18}

Lkt A of Mh belongs to the family of exotoxins produced by Gram-negative bacteria, called RTX toxins, as they contain a variable number of repeated amino acid domains rich in glycine, from which RTX (repeats-in-toxin) toxin family derives its name and cause a huge variety of characteristic effects on cells in which they act upon.^{9,45,47,52,53} RTX toxins

neumónicos, 29.4% en sangre, 25% en hígado y bazo, 72.2% en tracto genital, 89.5% en ubre y leche, 66.7% en tracto intestinal y 16.6% en cerebro.³⁶ En exudado nasal de ovinos se ha registrado 9.3% en México,³⁷ 15.8% en Estados Unidos de América³⁸ y 25% en Dinamarca,³⁹ y en pulmones neumónicos, 3.6% en Etiopía,⁴⁰ 7% en Hungría²¹ y 8.3% en Turquía.⁴¹

En estudios recientes realizados en México se encontraron frecuencias superiores a las registradas hasta ahora en otros países. En exudado nasal de bovinos se encontraron frecuencias de 69% en animales sanos y 67% en animales enfermos,^{32,33} y en pulmones neumónicos de bovinos, 71%.⁴²

Esta cepas NT normalmente corresponden al biotipo A⁴³ y se han descrito como mutantes de Mh, algunas de las cuales presentan deficiencias en la producción de antígenos solubles.⁴⁴ En este sentido, algunos estudios citados por Frank⁴³ mencionan la posibilidad de que cepas clasificadas como NT por la técnica de hemoaglutinación indirecta (HAI), quizá sean cepas serotificables mediante dicha técnica, pero que la imposibilidad de reaccionar a la HAI puede ser consecuencia de la pérdida de antígenos serotipo-específicos en la superficie celular, lo que corrobora las dificultades que se presentan para la serotipificación de Mh mediante la HAI.

Mecanismos de patogenicidad

Los mecanismos de patogenicidad de algunos de los miembros de la familia Pasteurellaceae no están aún muy claramente definidos, particularmente la patogénesis de la PNB, ya que algunos de los mecanismos que le permiten a Mh establecerse y diseminarse durante la infección, no están esclarecidos satisfactoriamente, incluso existe la posibilidad de que haya diferencias en dichos mecanismos entre las cepas aisladas de diversos cuadros neumónicos, así como de cepas procedentes de animales sanos.^{6,9,45}

En las cepas de Mh que afectan a los rumiantes se han identificado diversos mecanismos de expresión de su patogenicidad a través de potentes antígenos, los cuales incluyen: una leucotoxina (Lkt) con actividad específica contra leucocitos; lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PRH), fimbrias, enzimas (neuraminidasa, proteasas, metaloglicoproteasas), antígenos aglutinantes serotipo-específico y adhesinas; además de la cápsula y plásmidos de resistencia a antibióticos.^{6,8,14,46-48} Todos estos mecanismos juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad; sin embargo, sólo la Lkt es considerada como el factor de patogenicidad primario más importante.^{10,14,45,46} Todos los genes relacionados con los factores de virulencia identificados han sido localizados en el genoma de

have been found in the 12 Mannheimia serotypes.¹⁸

Mh Lkt is a thermolabile, calcium dependent, oxygen and pH stable, soluble in water protein. Its highest concentrations in its production take place in the logarithmic phase of the bacterium growth.^{54,55} It has been proven that iron is a required factor for the optimum growth of the bacterium and for Lkt production.⁵⁶

Mh Lkt genes have been sequenced and the toxin has been expressed in *E. coli*. The genetic organization of the Mh Lkt operon (*lktCABD*) is similar to the *E. coli* haemolysin operon (*hlyCABD*) and contains four genes. The first gene is the *lktC* that codifies a protein (LktC) that is responsible of the activation of the leukotoxin (Lkt) by acylation. The second one is the *lktA* which codifies the protein structure of the leukotoxin (LktA). Finally, genes *lktB* and *lktD* codify for proteins LktB and LktD, which together are responsible of the transport and secretion of the leukotoxin (LktA).^{10,14,45,52} Mh Lkt has a close specificity against target cells, it is cytotoxic versus ruminant leukocytes¹⁸ and has been identified to the CD18 molecule as the receptor that intervenes in the Lkt adherence with ruminant leukocytes.^{10,18,52,57}

LktA activity against the target cells is dose-dependent and can be classified in three categories. At very low concentrations, the leukotoxin activates the target cells in order to experiment a breathing interruption and degranulation. As the leukotoxin concentration increases, the target cells are stimulated to experiment apoptosis (programmed cell death). When the leukotoxin concentration is high, a target cell necrosis is caused as a consequence of the membrane damage due to the pore formation; therefore, the possibility of the respiratory mucosa colonization by the bacterium increases.^{9,10}

The best known effect of the RTX toxins on neutrophils is the formation of pores (0.9 to 3 nm diameter) which cross the membrane.¹⁸ In high concentrations, Lkt causes a quick (5-15 min) loss of intracellular potassium and the cell gets swollen. The formation of numerous damages in the plasmatic membrane depends on the calcium; among these, pores which could reach a 10 nm diameter on the surface of the cell are included. These pores cause the membrane to be permeable to ions and the discharge of water, originating cellular lysis.^{9,45,47}

Therefore, in BMn the alveolar macrophages play a central role in all cell processes and in the swelling cascade that leads to lung damage.¹⁰ Among leukocytes, macrophages are more resistant than neutrophils *versus* the Lkt lytic effect and among alveolar macrophages, those in adult bovines are more resistant than in less than 16 week old calves.²

The secretion induction and the discharge of vaso-

Mh A1, el cual ha sido secuenciado recientemente.⁴⁹

Leucotoxinas (Lkt)

Las Lkt son un grupo de exotoxinas que producen su efecto tóxico primario en contra de los leucocitos, en particular los leucocitos de rumiantes, especialmente las células polimorfonucleares (PMN).^{10,48,50,51} La toxina origina una amplia variedad de efectos biológicos sobre los leucocitos bovinos, cuyo resultado final es una pleuroneumonía fibrinosa aguda.^{10,50}

En estudios realizados en 1980¹⁸ se pudo comprobar que el sobrenadante libre de células de cultivos de Mh A1 podía producir fagocitosis a bajas concentraciones y era citotóxico a altas concentraciones; posteriormente se pudo descubrir que el sobrenadante contenía una leucotoxina (Lkt) termolábil secretada por Mh durante su crecimiento exponencial.^{9,18}

La Lkt A de Mh forma parte de la familia de exotoxinas producidas por bacterias gramnegativas, llamadas toxinas RTX, en razón de que contienen un número variable de dominios de aminoácidos repetidos ricos en glicina, de los cuales la familia de toxinas RTX (*repeats-in-toxin*) deriva su nombre y causan una amplia variedad de efectos característicos sobre las células en que actúan.^{9,45,47,52,53} Las toxinas RTX se han encontrado en los 12 serotipos del género Mannheimia.¹⁸

La Lkt de Mh es una proteína termolábil, calcio-dependiente, estable al oxígeno y al pH, y soluble en agua, y las más altas concentraciones en su producción se dan en la fase logarítmica del crecimiento de la bacteria.^{54,55} Se ha podido comprobar que el hierro es un factor requerido para el óptimo crecimiento de la bacteria y para la producción de la Lkt.⁵⁶

Los genes de la Lkt de Mh han sido secuenciados y la toxina se ha expresado en *E. coli*. La organización genética del operón de la Lkt de Mh (*lktCABD*) es similar a la del operón de la hemolisina de *E. coli* (*hlyCABD*), y contiene cuatro genes. El primer gen es el *lktC*, el cual codifica una proteína (LktC) que es la responsable de la activación de la leucotoxina (Lkt) por acilación. El segundo gen es el *lktA*, el cual codifica la estructura proteínica de la leucotoxina (LktA). Finalmente, los genes *lktB* y *lktD* codifican para las proteínas LktB y LktD, que en conjunto son responsables de la transportación y la secreción de la leucotoxina (LktA).^{10,14,45,52} La Lkt de Mh tiene una estrecha especificidad contra células blanco y es citotóxica contra los leucocitos de rumiantes,¹⁸ y se ha identificado a la molécula CD18 como el receptor que interviene en la adherencia de la Lkt con los leucocitos de rumiantes.^{10,18,52,57}

La actividad de la LktA contra las células blanco es dosis dependiente y se puede clasificar en tres cate-

active quimiotactic peptides by master cells, increases the number of available leukocytes in the swollen part where fibrinous deposits are produced; this process finally ends in an acute fibrinous pneumonia. Any opportunity of a secondary immune response is interrupted by the Lkt activity that prevents lymphocyte blastogenesis.¹⁰

Lkt interaction with the host's immune system is complex and intelligent; it induces biological effects in bovine leukocytes in a species-specific manner,^{47,58,59} it induces the host's system to work benefiting the bacterium, and leaving its tissues without protection against the infection.¹⁰

Outer membrane proteins (OMP)

Studies focused on the identification of cell surface proteins and OMP produced by several Mh serotypes, as potential immunogens to prevent bovine pneumonic pasteurellosis, have been followed.^{29,60}

Results of several studies highlight that Mh OMP constitute some of the most important antigens for the immune response stimulation against BMn,^{29,61} and a statistically significant correlation between the disease's resistance, and the presence of serum antibodies directed against a great amount of proteins present in saline extracts of the whole bacterial cell, has been proven.⁶¹⁻⁶³

Therefore, it is known that OMP have a great potential to develop immunogens, specially those exposed to the surface.^{9,63,64} Exposed proteins in the bacterial cell capsule are a great interest objective for the host's immune response. Two very important mechanisms in bovine immunity against Mh, death mediated by the complement and mediated phagocytosis by neutrophils, are improved by the bacteria's opsonization and by capsule elimination.⁶¹

It is considered that antibodies for OMP of Gram-negative bacteria also provide protection against Mh infection. It is probable that these antibodies promote phagocytosis, and maybe also death when the function of these proteins decreases.⁶⁰

Even if the role of the OMP, as a virulence factor is not yet quite clear, several studies have confirmed its importance in infection pathogenesis, and highlight its participating potential in the antibody response in antibacterial protection, and furthermore, in their participation transporting materials through the membrane (porines) and in the adhesion to the host cell.^{60,65}

In the same way, it has also been proven that isolated Mh OMP's are powerful modulators of the bovine polymorphonucleated leukocyte activity, and induce alterations in their biological activity; therefore, it is possible to observe *in vitro* a dependent dose reduc-

gorías. A muy bajas concentraciones la leucotoxina activa las células blanco para experimentar una interrupción de la respiración y la degranulación. A medida que la concentración de leucotoxina se incrementa, las células blanco son estimuladas para que experimenten apoptosis (muerte celular programada); cuando la concentración de la leucotoxina es alta se presenta una necrosis de las células blanco como consecuencia del daño a la membrana debido a la formación de poros. De esta manera, aumenta la posibilidad de colonización de la mucosa respiratoria por parte de la bacteria.^{9,10}

El efecto mejor conocido de las toxinas RTX sobre los neutrófilos es la formación de poros (0.9 a 3 nm de diámetro) que atraviesan la membrana.¹⁸ En altas concentraciones, la Lkt causa una rápida (5-15 min) pérdida del potasio intracelular y el hinchamiento de la célula. La formación de numerosos desperfectos de la membrana plasmática depende del calcio; entre ellos se incluyen poros hasta de 10 nm de diámetro sobre la superficie de la célula, estos poros hacen que la membrana celular sea permeable a los iones y a la salida de agua, lo que origina la lisis celular.^{9,45,47}

Por lo tanto, en la MnB los macrófagos alveolares desempeñan un papel central en todos los procesos celulares y en la cascada inflamatoria que conduce al daño pulmonar.¹⁰ Entre los leucocitos, los macrófagos son más resistentes que los neutrófilos contra el efecto lítico de las Lkt, y entre los macrófagos alveolares son más resistentes los de los bovinos adultos que los de becerros menores de 16 semanas de edad.²

La inducción de la secreción y la liberación de péptidos quimiotácticos vasoactivos por células maestras, aumenta el número de leucocitos disponibles en el lugar de la inflamación, en donde se producen depósitos fibrinosos, este proceso culmina en una neumonía fibrinopurulenta aguda. Cualquier oportunidad de respuesta inmune secundaria es interrumpida por la actividad de la Lkt, que previene la blastogénesis de los linfocitos.¹⁰

La interacción de la Lkt con el sistema inmune del huésped es compleja e inteligente; induce efectos biológicos en los leucocitos bovinos de una manera especie-específica,^{47,58,59} pone al sistema del huésped a trabajar en beneficio de la bacteria y deja a los tejidos de dicho portador desvalido en contra de la infección.¹⁰

Proteínas de membrana externa (PME)

Se han realizado estudios enfocados a la identificación de proteínas de la superficie celular y PME producidas por diversos serotipos de Mh como potenciales inmunógenos para prevenir la pasteurellosis neumónica en el ganado.^{29,60}

tion in the capacity of adherence to the nylon wall *in vitro*. It is believed that it is possible that small quantities of OMP stimulate chemotaxis and neutrophils' adherence, favoring, therefore, its accumulation in the initial inflammatory site.⁶⁵

In immunized mice with A1 Mh OMP, and challenged with alive A1 Mh, or with OMP, a bronchointerstitial pneumonia, very similar to MnB, was developed, besides, a high concentration of antibody titre against OMP was found, this suggest that the immune complex plays an important role in BMn's pathogenesis.⁶⁶

The meta-analysis of 27 studies performed during 12 years with experimental and commercial vaccines, revealed that those which contributed OMP, and other surface antigens, supplied the best protection levels against Mh challenges, equivalent to the one granted by alive vaccines.⁶⁷

Immunogenic capacity varies between the different Mh serotypes, this has been proven with ovine intra-tracheal challenges using A2, A7 and A9 Mh immunized with OMP extracts of the same serotypes, although high antibody levels were found, and only vaccine with OMP of S7 produced an effective protection against the homologue and heterologue infection by A2, A7 and A9 Mh.⁶⁸

It has been proven that the presence of antibodies against Mh OMP has a statistical correlation with the resistance to experimental challenges with this microorganism in cows. The gene, which codifies one of the above mentioned proteins (PlpE), could be cloned and sequenced, this protein is a lipoprotein similar to the *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipoprotein.⁶⁹ Subsequent studies have demonstrated that this recombinant protein (rPlpE) is highly immunogenic when it is injected subcutaneously in bovines, and the acquired immunity considerably increases in experimental challenges.^{70,71}

Sialoglycoprotease (Gcp)

Among the antigens in the supernatant of A1 Mh cultures, the O-sialoglycoprotein (Gcp) stands out, this Gcp is a neutral metalloprotease with an endopeptidase and neuroaminidase activity, and has the capacity to break up glycoprotein A type mucine in different sites.⁷²⁻⁷⁷

The presence of antibodies (IgG1 and IgG2) against Gcp could be proven by the use of the supernatant in one A1 Mh culture in a logarithmic growth phase, that contained a Gcp specific proteolytic enzyme, and was used to vaccinate and challenge groups of calves, and many of these calves' sera, IgG1 and IgG2 were found; furthermore, in those animals which had anti-Gcp antibodies a milder pneumonia was observed in the necropsy; these results demon-

Los resultados de diversos estudios resaltan que las PME de Mh constituyen algunos de los más importantes antígenos para la estimulación de respuesta inmune en contra de la MnB,^{29,61} y se ha podido comprobar una correlación estadísticamente significativa entre la resistencia a la enfermedad y la presencia de anticuerpos séricos dirigidos contra una gran cantidad de proteínas presentes en extractos salinos de la célula bacteriana íntegra.⁶¹⁻⁶³

Se sabe entonces, que las PME tienen un gran potencial para desarrollar inmunógenos, especialmente aquellas que están expuestas en la superficie.^{9,63,64} Las proteínas expuestas en la cápsula de la célula bacteriana son un objetivo de gran interés para la respuesta inmune del huésped. Dos mecanismos muy importantes en la inmunidad de los bovinos en contra de Mh: la muerte mediada por el complemento y la fagocitosis mediada por los neutrófilos, son mejorados por la opsonización de la bacteria y por la eliminación de la cápsula.⁶¹

Se considera que los anticuerpos para las PME de las bacterias gramnegativas también suministran protección contra la infección por Mh. Es probable que estos anticuerpos promuevan la fagocitosis y quizá también la muerte, al disminuir la función de estas proteínas.⁶⁰

Si bien el papel de las PME como factor de virulencia no está del todo dilucidado, diversos estudios han confirmado su importancia en la patogénesis de las infecciones y resaltan su participación potencial en la respuesta de anticuerpos en la protección antibacteriana, además de que participan como transportadoras de materiales a través de la membrana (porinas) y en la adhesión a la célula huésped.^{60,65}

De igual manera, se ha podido comprobar que las PME aisladas de Mh son poderosas moduladoras de la actividad de los leucocitos polimorfonucleados de bovinos e inducen alteraciones en su actividad biológica, de tal manera que es posible observar *in vitro*, una reducción dosisdependiente en la capacidad de adherencia a la pared de nailon. Se cree que es posible que pequeñas cantidades de PME estimulen la quimiotaxis y la adherencia de los neutrófilos, favoreciendo de esta manera su acumulación en el foco inflamatorio inicial.⁶⁵

En ratones inmunizados con PME de Mh A1 y desafiados con Mh A1 viva, o con PME, se desarrolló neumonía broncointersticial muy similar a la MnB, además, se presentó una alta concentración de títulos de anticuerpos contra las PME, lo cual sugiere que el complejo inmune juega un papel muy importante en la patogénesis de la MnB.⁶⁶

El metaanálisis de 27 estudios realizados a lo largo de 12 años con vacunas experimentales y comerciales, reveló que aquellas que aportaron PME y otros anti-

trated that Gcp is immunogenic, and that the bacteria produces the enzyme *in vivo*.⁷⁵ Serum of convalescent bovines presents a Gcp activity, which suggests that this Gcp is immunogenic in animals.¹⁸

Target cells of Gcp have not yet been defined, but probably are sialoglycoproteins present in the surface of cells of the mucosa surface, alveolar macrophages, alveolar neutrophils or other leukocytes.¹⁸ Although the role of the Gcp in the pathogenesis has not been quite demonstrated, it has been suggested that its activity interferes with the adhesion of the neutrophils by a split of the O-sialoglycoprotein of cell adhesion molecules; alternatively, Gcp can interfere with the immune response of the host by a split of serum IgG molecules, or maybe contributes in the bacterial colonization.^{18,78} Gcp gen has already been cloned and sequenced in *E. coli*; unfortunately, Gcp was found added and inactive in the *E. coli* periplasma.⁷² It was possible to induce significant protection in calves that had been challenged with the administration of only Gcp as a vaccine.⁷⁹

Neuraminidase

Neuraminidase is produced by Mn *in vivo*, as anti-neuraminidase antibodies can be found in goats sera after a bacterial transthoracic infection.⁸⁰ Although the role of neuraminidase in bovine pneumonia is unknown, this enzyme has been related as a virulence factor in several mucosa pathogens.¹⁸ Neuraminidase production by *Pasteurella* species was recorded the first time in 1970, it was demonstrated that 102 out of 104 strains of *P. multocida*, and 3 out of 5 strains of *P. haemolytica*, had produced the enzyme.^{80,81} Straus *et al.*⁸¹ could demonstrate that all Mh serotypes, except A11 (Mg), are capable of producing neuraminidase.

It has been demonstrated that salivary secretion protecting activity is reduced when salivary glycoprotein sialic acid residues are removed, it is possible that neuraminidase causes a pathogenic effect through the removal of glycoprotein sialic acid residues of the host, therefore, reduce the mucus protection effect, increasing Mh adherence to the mucosa epithelium particularly in the upper respiratory tract.^{9,82,83} It has also been demonstrated that A1 Mh isolation could produce higher levels of neuraminidase than A2 strains; this is clear evidence that neuraminidase is involved in the Mh invasion in pneumonic processes.^{84,85}

Lipopolysaccharides (LPS)

Mh LPS is structurally similar than a typical Gram-negative bacterium. This LPS have inherent Gram-negative endotoxin activities: pyrogenic, macrophage activation, tumor factor induction, cascade coagula-

genos de superficie, suministraron los mejores niveles de protección contra desafíos con Mh, equivalente al proporcionado por vacunas vivas.⁶⁷

La capacidad inmunogénica varía entre los diferentes serotipos de Mh, esto se ha podido comprobar con desafíos intratraqueales de ovejas con Mh A2, A7 y A9, inmunizadas con extractos de PME de los mismos serotipos. Aunque se encontraron altos niveles de anticuerpos, sólo la vacuna con PME de S7 produjo protección efectiva contra infección homóloga y heteróloga por Mh A2, A7 y A9.⁶⁸

Se ha comprobado que la presencia de anticuerpos contra PME de Mh tiene una correlación estadística con la resistencia a desafíos experimentales con dicho microorganismo en vacas. Se pudo clonar y secuenciar el gene que codifica una de dichas proteínas (PlpE), la cual es una lipoproteína similar a una lipoproteína de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.⁶⁹ Estudios posteriores han podido demostrar que esta proteína recombinante (rPlpE) es altamente inmunogénica cuando se inyecta por vía subcutánea en bovinos y la inmunidad adquirida aumenta considerablemente en desafíos experimentales.^{70,71}

Sialoglicoproteasa (Gcp)

Entre los antígenos presentes en el sobrenadante de cultivos de Mh A1 destaca una O-sialoglicoproteína (Gcp) que es una metaloproteasa neutra, con actividad de endopeptidasa y neuroaminidasa, que tiene la capacidad de fraccionar glicoproteína A tipo mucina en diferentes sitios.⁷²⁻⁷⁷

La presencia de anticuerpos (IgG1 e IgG2) contra la Gcp se pudo comprobar mediante el uso de sobrenadante de un cultivo de Mh A1 en fase de crecimiento logarítmico, que contenía una enzima proteolítica específica para Gcp y con el cual se vacunaron y se desafiaron grupos de becerros; en muchos de estos sueros se pudo comprobar que contenían IgG1 e IgG2; además, aquellos animales que tuvieron anticuerpos anti-Gcp, presentaron una neumonía más leve a la necropsia; estos resultados demostraron que la Gcp es inmunogénica y que la bacteria produce la enzima *in vivo*.⁷⁵ El suero de bovinos convalecientes presenta actividad de Gcp, lo cual sugiere que esta Gcp es inmunogénica en los animales.¹⁸

Las células blanco de la Gcp aún no han sido bien definidas, pero probablemente son sialoglicoproteínas presentes en la superficie de las células de la superficie de la mucosa, macrófagos alveolares, neutrófilos alveolares u otros leucocitos.¹⁸ No obstante que el papel de la Gcp en la patogénesis no ha sido demostrado convenientemente, se ha sugerido que su actividad interfiere con la adhesión de los neutrófilos por una escisión de la O-sialoglicoproteína de las moléculas

tion activation, platelet aggregation and endotoxic shock induction.^{2,86}

Intrabronchial administration of purified Mh LPS originated fibrine and neutrofile exudation, pulmonary edema and platelet aggregation in the capillaries; LPS was regarded as the main cause for microvascular necrosis and thrombosis.^{18,86,87} A1Mh LPS was capable to produce direct damage on pulmonary artery endothelial cells *in vitro*; demonstrating the potential function of endotoxins in the BMn vascular damage pathogenesis.⁸⁶

LPS participation could be the result of the functions modulated by bovine leukocytes, and the simulation of the host's inflammatory response; in this way, damage to their tissues is exacerbated. LPS also participates as mediator in the increase of pro-inflammatory cytokines, mediating lipids, pro-coagulants, oxygen radicals and proteases, generated by bovine monocytes and macrophages.^{2,18} It has been demonstrated that LPS increases both the Lkt cytolytic activity and the Lkt-dependent expression of the IL8 and the alfa (TNF- α) tumoral necrosis factor.^{88,89} It is probable that *in vivo* LPS and Lkt act synergically causing damage to tissues and inflammation.⁹

Adhesines

It is generally known that bacteria can adhere to epithelial surfaces through specific receptors, as the involved bacterial factors in the bacteria-cell interaction are very diverse; there are several bacterial structures that could participate in the adherence such as the fimbria, non fimbrial adhesines, protein adhesines, glycocalix, LPS, external membrane proteins and the capsule.⁸³ Very little is known about the participating molecules in the Mh ability to colonize pharynx and tonsil crypts; it is probable that it codifies an adhesine that allows the bacterium to attack the respiratory epithelium,⁹ the participation of LPS, fimbria and glycocalix⁸³ has also been mentioned; the Mh LPS capacity to produce *in vitro* adherence⁸⁷ has also been demonstrated, and the polysaccharide component facilitates that MH can specifically join phagocytes and avoid their functions development.⁸³ It is known that there are two types of fimbria in Mh, some of them are 12 nm long and rigid, and others are 5 nm short and flexible, which were evident specially when bacteria were recovered from experimentally or naturally infected calves tracheal washing samples.⁵¹

The functional role of Mh adhesines in the pathogenesis needs to be studied with more detail; nevertheless, it is very probable that this adhesine participates in a host cell sequential recognizing process that precedes the catalytic activity exoprotein liberation, such as the endopeptidase or the neuraminidase, or

de adhesión celular; alternatively, la Gcp puede interferir con la respuesta inmune del huésped por una escisión de las moléculas de la IgG séricas o quizá contribuya en la colonización bacteriana.^{18,78} El gen de Gcp ya fue clonado en *E. coli* y secuenciado, desafortunadamente la Gcp se encontró agregada e inactiva en el periplasma de *E. coli*.⁷² En becerros que habían sido desafiados con Mh A1 se logró inducir una protección significativa con la administración solamente de la Gcp como vacuna.⁷⁹

Neuraminidasa

La neuraminidasa es producida por Mh *in vivo*, ya que anticuerpos antineuraminidasa se pueden encontrar en el suero de cabras después de una infección transitoria con bacterias.⁸⁰ No obstante que el papel de la neuraminidasa en la neumonía bovina es desconocido, esta enzima ha sido implicada como factor de virulencia en diversos patógenos de mucosas.¹⁸ La producción de neuraminidasa por especies de *Pasteurella* se registró por primera vez en 1970, demostrando que 102 de 104 cepas de *P. multocida* y tres de cinco cepas de *P. haemolytica* habían producido la enzima.^{80,81} Straus *et al.*⁸¹ pudieron demostrar que todos los serotipos de Mh, excepto el serotipo A11 (Mg), son capaces de producir neuraminidasa.

Se ha demostrado que la actividad protectora de la secreción salivar se reduce cuando se remueven los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas salivares; es posible que la neuraminidasa ejerza un efecto patogénico mediante la remoción de los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas del huésped, y de esta manera reduce el efecto protector del moco, incrementando la adherencia de Mh al epitelio de la mucosa, particularmente en el tracto respiratorio superior.^{9,82,83} También se ha podido demostrar que aislamientos de Mh A1 pudieron producir niveles más altos de neuraminidasa que cepas del serotipo A2, lo cual puede evidenciar que la neuraminidasa está involucrada en la invasión de Mh en los procesos neumónicos.^{84,85}

Lipopolisacáridos (LPS)

El LPS de Mh es estructuralmente similar al de una bacteria típica gramnegativa. Este LPS tiene las actividades propias de las endotoxinas gramnegativas: pirogénicas, activación de macrófagos, inducción del factor de tumoración, activación de la coagulación en cascada, agregación de plaquetas e inducción del choque endotóxico.^{2,86}

La administración intrabronquial de LPS purificado de Mh originó la exudación de fibrina y neutrófilos, edema pulmonar y agregación de plaquetas

both. It is considered that Mh adhesins constitute an alternative as a potential immunogen for vaccine development against BMn.⁷⁷

In recent studies in Mexico, Jaramillo *et al.*⁷⁷ achieved the purification by affinity of a 68 kDa adhesin that was capable to agglutinate rabbit erythrocytes, concluding that Mh adhesins play a very important role within infection. Mh adhesin is similar to a high molecular weight adhesin characterized in non typifiable *H. influenzae* strains.¹⁸

Plasmids

The presence of resistant plasmids to antimicrobials has been demonstrated in Mh, although this presence of plasmids is not a characteristic phenomenon within all species, some strains have only got one small plasmid (approximately 4.2 kb) that is responsible for resistance against streptomycin and sulfonamide.^{9,18,51} In studies with A1 Mh strains, in the majority of them a plasmid that codified β -lactamase could be isolated, only a few showed two or none plasmids.⁴ Not all plasmids found are associated with resistance to antimicrobials, paradoxically, it was possible to find resistance in the absence of plasmids, and some of them were correlated with the leukotoxin or other virulent factors.^{9,51}

Plasmids play a very important role in the genetic structure of the Mh antimicrobial resistance. Between resistant genes to antimicrobials, one of the most frequent ones in Mh is the one resistant to sulfonamides (*suII*). The majority of these genes has been found in 4.2 to 16.7 kb plasmids, some of them also generate resistance against streptomycin, kanamycin and tetracyclines; in addition, the resistance to β -lactams is associated with small 4.2 to 5.2 kb plasmids. A small plasmid less than 10 kb has also been identified associated with aminoglycoside resistance, as well as another one of 113 kb resistant to streptomycin, kanamycin, tetracyclines and sulfonamides; in the same way, streptomycin resistant gene (*strA*) has been found in plasmids as well as in the chromosome of Mh; the resistance to chloramphenicol is mainly mediated by chloramphenicol-acetyltransferases, most of these chloramphenicol-acetyltransferases are located in plasmids identified in Mh.⁹⁰

Diagnosis

There are several laboratory techniques to detect and identify Mh including: isolation and phenotypification, serotypification and genotypification.

An *in vitro* culture in blood agar based medium, as well as biochemical tests are used to isolate and phenotypify Mh. With the procedures mentioned above

en los capilares, implicando al LPS como la principal causa de necrosis microvascular y trombosis.^{18,86,87} El LPS de Mh A1 fue capaz de causar daño directo sobre las células del endotelio de las arterias pulmonares *in vitro*; demostrando la función potencial de las endotoxinas en la patogénesis de la lesión vascular en la MnB.⁸⁶

La participación del LPS podría ser el resultado de las funciones moduladas por los leucocitos bovinos y la simulación de la respuesta inflamatoria del huésped, de este modo se exagera el daño a sus tejidos; de igual manera, el LPS participa como mediador en el incremento de las citocinas proinflamatorias, lípidos mediadores, procoagulantes, radicales de oxígeno y proteasas, generados por los monocitos y los macrófagos bovinos.^{2,18} Se ha podido demostrar que el LPS incrementa la actividad citolítica de la Lkt y que aumenta la expresión Lkt-dependiente de la IL8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).^{88,89} Es probable que *in vivo*, el LPS y la Lkt actúen de manera sinérgica causando daño a los tejidos e inflamación.⁹

Adhesinas

Se sabe de manera general que las bacterias se pueden adherir a las superficies epiteliales a través de receptores específicos, de tal manera que los factores bacterianos involucrados en la interacción bacteria-célula son muy diversos; entre algunas de las estructuras bacterianas que pudieran participar en la adherencia se reconocen las fimbrias, adhesinas no fimbriales, adhesinas proteináceas, el glicocálix, el LPS, proteínas de membrana externa y la cápsula.⁸³ Poco se sabe acerca de las moléculas que participan en la habilidad de Mh para colonizar la faringe y las criptas tonsilares; es probable que codifique una adhesina que permita a la bacteria atacar el epitelio respiratorio,⁹ también se ha mencionado la participación del LPS, las fimbrias y el glicocálix;⁸³ se ha podido demostrar la capacidad del LPS de Mh para producir adherencia *in vitro*,⁸⁷ también se conoce que el componente del polisacárido capsular facilita que Mh pueda unirse específicamente a los fagocitos e impedir el desarrollo de sus funciones.⁸³ Se sabe que existen dos tipos de fimbrias en Mh, unas largas y rígidas de 12 nm, y otras cortas y flexibles de 5 nm, las cuales pudieron ser evidenciadas especialmente cuando las bacterias fueron recuperadas de lavados traqueales de becerros infectados experimental o naturalmente.⁵¹

El papel funcional de las adhesinas de Mh en la patogénesis debe ser estudiado con más detalle, no obstante es muy posible que esta adhesina participe en un proceso secuencial de reconocimiento de la célula huésped, que precede a la liberación de exoproteínas con actividad catalítica, como la endopepti-

it is possible to determine the colonies' morphology, hemolysis production, as well as its biochemical behavior in order to identify and biotypify Mh.^{15,16} The above mentioned are conventional available methods, and besides them, there are alternative ones which are based on miniaturized commercially available systems that facilitate and speed up phenotypification; examples of the latter ones are the API 20E and 20NE*, Diagnostic Capelets** and the OxiFerm*** system, which have been widely used as an enterobacteriae and non-enterobacteriae identification tool in veterinary medicine with very satisfactory results.^{7,35,39,91-94}

Hemagglutination techniques are used for serotyping through the use of specific reference antisera for the 12 recognized serotypes. Another serologic test that can be used is the simple visual assay technique from the obtention of LktA of Mh isolates, in order to determine the presence of anti-LktA antibodies in the sera of problem animals, another test is the immunoelectrotransfer technique from obtained proteins of the Mh external membrane, that are used as antigens to determine the recognition pattern by antibodies against the above mentioned antigens.¹⁶

Variability and complexity of phenotypic- and genotypic characteristics of Mh genus make it difficult, in a high degree, the classification of the isolates through routine laboratory techniques, based on conventional descriptive criteria, that make the precise taxonomy classification impossible. Classical techniques used to identify bacteria, such as biotypification, serotyping, susceptibility pattern determination to antimicrobials and fagotyping, are based on phenotypic differences; nevertheless, these techniques are limited due to the capability of bacterium to changing, without any notice, the expression of some of their characteristics, therefore, isolates from the same strain can vary phenotypically; additionally, some of these methods are limited due to the relatively high number of strains that are phenotypically null, i.e., non typifiable.^{95,96}

Phenotypical methods used to characterize *Mannheimia* species have been used for a long time, and although their reproducibility is high, their limitations have been widely recognized.^{39,97} It has been demonstrated in studies to evaluate the specificity of serotyping, as a diagnostic tool, that it is not a trustworthy method to correctly identify Mh; emphasis is stressed on the need of a broad phenotypic- and genotypic characterization for an adequate typification of this microorganism, considering the difficulties that other studies have presented on its classification, based only on the phenotypification and serotyping,^{25,39,98} keeping in mind that *Mannheimia* genus includes taxons with great both phenotypic and genotypic heterogeneity.³⁹

dasa o neuraminidasa, o ambas. Se considera que las adhesinas de Mh constituyen una alternativa como un inmunógeno potencial para el desarrollo de vacunas en contra de la MnB.⁷⁷

En estudios recientes en México, Jaramillo *et al.*⁷⁷ lograron la purificación por afinidad de una adhesina de 68 kDa que fue capaz de aglutinar específicamente eritrocitos de conejo, concluyendo que las adhesinas de Mh juegan un importantísimo papel en la infección. La adhesina de Mh es similar a una adhesina de alto peso molecular caracterizada en cepas no tipificables de *H. influenzae*.¹⁸

Plásmidos

En Mh se ha podido demostrar la existencia de plásmidos de resistencia a antibióticos; aun cuando la presencia de plásmidos no es un fenómeno característico entre todas las especies, algunas cepas poseen sólo un plásmido pequeño (aproximadamente 4.2 kb), el cual es responsable de la resistencia contra estreptomycin y sulfonamidas.^{9,18,51} En estudios con cepas de Mh A1, en la mayoría de ellas se pudo aislar un plásmido que codificaba una β -lactamasa, sólo unas pocas presentaron dos o ningún plásmido.⁴ No todos los plásmidos encontrados están asociados con resistencia a antibióticos, paradójicamente fue posible encontrar resistencia en ausencia de plásmidos y algunos de ellos fueron correlacionados con la leucotoxina u otros factores de virulencia.^{9,51}

Los plásmidos juegan un papel muy importante en la estructura genética de resistencia antimicrobiana de Mh. Entre los genes de resistencia a antimicrobianos uno de los más frecuentes en Mh es el de resistencia a sulfonamidas (*suII*). La mayoría de estos genes se han encontrado en plásmidos de 4.2 a 16.7 kb, algunos de los cuales también generan resistencia contra estreptomycin, kanamicina y tetraciclinas; asimismo, la resistencia a β -lactámicos está asociada con pequeños plásmidos de 4.2 a 5.2 kb; también se ha identificado un pequeño plásmido de menos de 10 kb, asociado con resistencia a aminoglicósidos, así como uno de aproximadamente 113 kb de resistencia con estreptomycin, kanamicina, tetraciclinas y sulfonamidas; de igual manera, el gen de resistencia a estreptomycin (*strA*) se ha encontrado tanto en plásmidos como en el cromosoma de Mh; la resistencia a cloranfenicol está mediada principalmente por las cloramfenicol-acetiltransferasas, muchas de las cuales están localizadas en plásmidos que han sido identificados en Mh.⁹⁰

Diagnóstico

Para la detección e identificación de Mh se cuenta con diversas técnicas de laboratorio que incluyen: ais-

It is evident that studies on epidemiologic characterization require the use of both methods, namely, phenotypic and genotypic ones. Several molecular biology techniques have demonstrated its usefulness in taxonomy, pathogenesis and epidemiology studies of Mh. Among the used techniques in several research studies on molecular epidemiology on Mh isolates, the most outstanding ones are: restriction analysis for the RNAr gene detection or ribotyping, restriction fragment length polymorphism (RFLP), restriction of endonuclease analysis (REA) of chromosomal DNA, DNA-DNA hybridization, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), DNA sequencing, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphisms (AFLPs).^{15,39,97-99} All of these methods are based on bacterial DNA polymorphism, and its high power, related with discrimination for strain differentiation above conventional phenotypic typification methods, has been demonstrated.^{15,95,96,100}

Prevention and control

Given the complexity that involves the multi-causal nature of this disease, prevention and control measures are still a polemic issue for analysis because of its immunization efficacy and efficiency, the use of chemotherapeutics and the control of medical-environmental factors that favor stress in animals, and Mh invasive action through its complex virulence mechanisms.

Traditionally, the treatment against BMn has been based on the intensive use of antimicrobials, including as well the massive herd treatment; this has led to an increase in Mh multi-resistant strain incidence. Therefore, prevention with vaccination is better than the disease's control with chemotherapeutics.⁹ Antimicrobial selection to be used, is rarely based on previous *in vitro* sensitivity studies of isolated strains from nasal or tracheal exudates, considering, moreover, that these isolates do not necessarily reflect the presence of microorganisms in lung tissue.¹⁰¹

A great variety of antimicrobials has been used to treat BMn; this mainly includes penicilin, oxytetracycline, trimetoprim/sulfadoxine, ampicilin, tilmicosin, florfenicol and tulathromycin. Although all of them have shown efficacy, it has been proven that there is resistance against penicilin, ampicilin, tetracycline, sulfonamides and tilmicosin in many Mh isolates.¹⁰² A wider review on dose and antimicrobial efficacy for Mh treatment, as well as on Mh antimicrobial resistance, is found in Rice *et al.*¹⁰² and Highlander.⁹

There is a varied number of vaccines in the market, unfortunately, there is not a lot of published information found in journals regarding their efficacy in

lamiento y fenotipificación, serotipificación y genotipificación.

Para el aislamiento y fenotipificación se utiliza el cultivo *in vitro* en medios a base de agar sangre, además de pruebas bioquímicas, todo lo cual permite determinar la morfología de las colonias, la producción de hemólisis, así como su comportamiento bioquímico para efectos de su identificación y biotipificación.^{15,16} Además de los métodos convencionales disponibles para la identificación bioquímica de Mh, se dispone de otros métodos alternativos, que se basan en sistemas miniaturizados disponibles comercialmente y que facilitan y agilizan la fenotipificación; entre ellos se encuentra el sistema API 20E y 20NE,* tabletas diagnósticas** y el sistema OxiFerm,** que se han usado ampliamente como una herramienta en la identificación de enterobacterias y no enterobacterias en medicina veterinaria, con resultados muy satisfactorios.^{7,35,39,91-94}

Para la serotipificación se emplean técnicas de hemoaglutinación mediante la utilización de antiseros de referencia específicos para los 12 serotipos reconocidos. Otra prueba serológica que se puede utilizar es la técnica de ensayo visual simple a partir de la obtención de LktA de aislamientos de Mh, para determinar la presencia de anticuerpos anti-LktA en el suero de los animales problema; de igual manera, mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia, a partir de proteínas obtenidas de la membrana externa de Mh, que se emplean como antígenos para determinar el patrón de reconocimiento por anticuerpos contra dichos antígenos.¹⁶

La variabilidad y complejidad de las características fenotípicas y genotípicas del género *Mannheimia* dificultan en gran medida la clasificación de los aislamientos a través de las técnicas de laboratorio rutinarias, basadas en criterios descriptivos convencionales, que hacen imposible la clasificación taxonómica precisa. Las técnicas clásicas para la identificación de bacterias, tales como la biotipificación, serotipificación, determinación de patrones de susceptibilidad a antibióticos y fagotipificación, se basan en diferencias fenotípicas, no obstante estas técnicas se ven limitadas por la capacidad de las bacterias de alterar, de manera impredecible, la expresión de algunas de sus características, de tal manera que aislamientos de una misma cepa pueden variar fenotípicamente; adicionalmente, algunos de estos métodos se ven limitados por la relativa gran cantidad de cepas que son fenotípicamente nulas, es decir, no tipificables.^{95,96}

Los métodos fenotípicos para la caracterización de las especies de *Mannheimia* se han utilizado durante

*Analytab Products Inc., Biomeieux, MR Francia.

**Diatabs, MR, Rosco, Dinamarca.

***Roche, MR, Estados Unidos de América.

studies including controlled challenges or under field conditions.^{9,103}

Apparently, these vaccines only provide a partial protection, and some of them, such as those prepared from whole cells, can increase morbidity within the herd.¹⁰⁴ Another prevention strategy in fattening animals has been the use of vaccines against viral agents only; but this has also not been quite effective.¹⁰³

The development of effective vaccines against BMn mainly depends on the detailed knowledge of Mh antigens and virulence factors, that are necessary to stimulate an immune protection. These pathogens include bacterial surface components (LPS, OMP) as well as secreted molecules (Lkt).⁹

A correlation between titres of neutralizing anti-leukotoxin antibodies and the resistance to the disease has been demonstrated; nevertheless, the use of LKt alone, purified or recombined has not been enough to originate protection.^{62,78} In the same way, the use of capsular polysaccharides combined with Lkt has not generated any protection either; nevertheless, the culture supernatant mixed with recombinant Lkt has been effective in assays with challenged animals, that suggests that the best vaccine option for BMn is the mixture of Lkt associated with supernatant antigens.⁹

There has been information about a few successful results with the use of live vaccines, nevertheless, there is the worry about a possible virulence of these strains.^{105,106}

Recent studies have been focused to reach local immunity induction against Mh by the liberation of antigens through the mucosa, reducing the colonization of the nasopharynx by the microorganism,¹⁰² via Mh antigen expression in viral vectors, which would facilitate the replication in the upper respiratory tract, or the oral administration of those antigens encapsulated in alginate microspheres,^{102,107} as well as by the development through genetic engineering of plants for Mh antigen expression in order to produce edible transgenic vaccines.¹⁰⁸ These plant derived antigens were immunogenic when they were injected in rabbits, and also when oral vaccines stimulated an immune response in calves' mucosa.¹⁰⁹

Conclusions

The impact of BMn in the bovine industry, in both beef- and dairy cattle, has been widely proven in several studies in North America as well as in Europe.^{1,2} Unfortunately, very little is known in countries in Latin America, and particularly, in Mexico. This disease is considered to be the most important one in beef cattle, and the second one, after gastrointestinal ones, in dairy calves.⁷

BMn is triggered as a consequence of an imbalance

mucho tiempo y aunque se acepta que su reproducibilidad es alta, sus limitaciones ya han sido reconocidas ampliamente.^{39,97} En estudios realizados para evaluar la especificidad de la serotipificación como una herramienta diagnóstica, se ha demostrado que no es un método confiable para la correcta identificación de Mh, y se hace énfasis sobre la necesidad de una amplia caracterización fenotípica y genotípica para la adecuada tipificación de este microorganismo, considerando las dificultades que han presentado otros estudios para su clasificación, basada solamente en la fenotipificación y la serotipificación,^{25,39,98} teniendo en cuenta que el género *Mannheimia* abarca taxones de una gran heterogeneidad fenotípica y genotípica.³⁹

Es evidente que los estudios sobre caracterización epidemiológica requieren del uso tanto de los métodos fenotípicos como genotípicos. Diversas técnicas de biología molecular han demostrado su utilidad en el estudio de la taxonomía, patogénesis y epidemiología de Mh. Entre las técnicas empleadas en diversas investigaciones sobre la epidemiología molecular de aislamientos de Mh se pueden destacar las siguientes: análisis de restricción para la detección de los genes del ARNr o ribotipificación, polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de endonucleasas de restricción (REA) del ADN cromosomal, hibridación de ADN-ADN, electroforesis de enzimas multilocus (EEML), amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD), secuenciación del ADN, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).^{15,39,97-99} Todos estos métodos tienen como base el estudio del polimorfismo del ADN bacteriano y se ha demostrado su alto poder de discriminación para la diferenciación de cepas, superior a los métodos convencionales de tipificación fenotípica.^{15,95,96,100}

Prevención y control

Dada la complejidad que involucra la multicausalidad de esta enfermedad, las medidas de prevención y control siguen siendo motivo de análisis y polémica respecto de su eficacia y la eficiencia de la inmunización, el empleo de quimioterapéuticos y el control de factores medioambientales que propician el estrés en los animales y favorecen la acción invasora de Mh a través de sus complejos mecanismos de virulencia.

Tradicionalmente, el tratamiento contra la MnB se ha basado en el uso intensivo de antibióticos, incluyendo, además, el tratamiento masivo de hatos, lo cual ha determinado un incremento en la incidencia de cepas multirresistentes de Mh. De ahí que sea preferible una prevención y control de la enfermedad, basada más en la vacunación que en la quimioterapia.

in the interaction of the triad constituted by one or more infectious agents, the hosts defense and environmental stress factors; nevertheless, there is a coincidence in the majority of the studies on this etiologic complexity that the principal etiologic agent involved in the microorganism is AI Mh.^{2,6,8-10}

Pathogenicity mechanisms of this bacterium have not yet been clarified, and it is possible that there are differences between isolated strains of different pneumonic cases or from healthy animals.^{6,9,45} There are several identified pathogenicity mechanisms in Mh that have been the reason for an analysis and discussion in various studies.^{6,8,14,46,47} Among these, the most outstanding one is Lkt as the most important factor and more widely studied, even that its proven immunogenic capacity in some of the above mentioned mechanisms, Lkt is considered to play the most predominant role in the induction of a protecting response.^{9,18}

There are still enigmas towards Mh, particularly those related with pathogenicity, virulence and taxonomic aspects due to the variability and complexity of *Mannheimia* phenotypic and genetic characteristics, as well as to the difficulties in its genetic manipulation.⁹ For a better understanding of the epidemiology, and the importance of all Mh species it is necessary to adopt new criteria for its identification, including the use of molecular techniques, as well as more sensitive isolation procedures and biochemical and immunological identification.

Phenotypical classification methods, in spite of their high reproducibility, present limitations. Serotyping, in particular, is not reliable by itself, if it is not supported by a solid biochemical characterization. Therefore, the adequate typification of this microorganism requires a wide phenotypic- and genotypic characterization.^{25,44,97,98}

Research based on experimental challenge assays or on the study of epidemiology, taxonomy and virulence, will contribute paramount information regarding *Mannheimia haemolytica* behavior in bovines and other animal species.

The most effective prevention and control measurements against BMn should be supported by a combination of a series of activities that include a reliable diagnosis, vaccines and effective therapeutical methods and good management practices.

Referencias

1. LEKEU P. Bovine respiratory disease complex. Ann Med Vet 1996; 140: 101-105.
2. ZECCHINON L, FETT T, DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005; 36:133-156.
3. TRIGO T. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. Cien Vet 1987; 4:1-36.

pia.⁹ La selección de los antimicrobianos a emplear, raramente se basa en estudios previos de sensibilidad *in vitro* de cepas aisladas a partir de exudado nasal o traqueal, considerando, además, que estos aislamientos no reflejan necesariamente los microorganismos presentes en el tejido pulmonar.¹⁰¹

Para el tratamiento de la MnB se ha empleado una gran variedad de antimicrobianos que incluyen principalmente penicilinas, oxitetraciclina, trimetoprim/sulfadoxina, ampicilina, tilmicosín, florfenicol y tula-tromicina, y aunque todos ellos han demostrado eficacia, también se ha podido comprobar la resistencia contra penicilina, ampicilina, tetraciclina, sulfonamidas y tilmicosín en muchos aislamientos de Mh.¹⁰² Una revisión más amplia sobre dosificación y eficacia de diversos antimicrobianos en el tratamiento de la MnB, así como sobre resistencia a antimicrobianos de Mh, se encuentra en Rice *et al.*¹⁰² y Highlander.⁹

Existe en el mercado una amplia gama de vacunas, desafortunadamente no hay mucha información publicada en revistas arbitradas que sustenten su eficacia en estudios con desafíos controlados o en condiciones de campo.^{9,103}

Aparentemente, estas vacunas sólo aportan una protección parcial, incluso algunas, como las preparadas a base de células íntegras, pueden llegar a incrementar la morbilidad en el hato.¹⁰⁴ Otra estrategia de prevención en lotes de engorda ha sido el empleo de vacunas únicamente contra agentes virales, la cual también ha resultado poco efectiva.¹⁰³

El desarrollo de vacunas efectivas contra la MnB depende primordialmente del conocimiento detallado de los antígenos y factores de virulencia de Mh, necesarios para estimular una protección inmune. Estos antígenos incluyen componentes de la superficie bacteriana (LPS, OMP) además de moléculas secretadas (Lkt).⁹

Se ha podido demostrar correlación entre los títulos de anticuerpos antileucotoxina neutralizantes y la resistencia a la enfermedad; sin embargo, el empleo de la Lkt sola, purificada o recombinante, no ha sido suficiente para originar protección.^{62,78} De manera similar, el empleo de polisacáridos capsulares combinados con Lkt tampoco ha generado protección; sin embargo, el sobrenadante de cultivos mezclados con Lkt recombinante ha sido efectivo en ensayos con animales desafiados, lo que sugiere que la mejor opción como vacuna para la MnB sea la mezcla de Lkt asociada con antígenos de sobrenadante.⁹

También se ha informado sobre algunos resultados exitosos mediante el uso de vacunas vivas; sin embargo, existe la preocupación respecto a la posible virulencia de estas cepas.^{105,106}

Estudios recientes se han enfocado a lograr la inducción de inmunidad local contra Mh, mediante

4. MURPHY GL, ROBINSON LC, BURROWS GE. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. J Clin Microbiol 1993; 31:2303-2308.
5. PIJOAN P, AGUILAR R, MORALES A. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California. Vet Méx 1999;30:149-155.
6. LO RY. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. Vet Microbiol 2001; 83:23-35.
7. KATSUDA K, KAMIYAMA M, KOHMOTO M, KAWASHIMA K, TSUNEMITSU H, EGUCHI M. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. Vet J 2007; 178:146-148.
8. BURROWS LL, OLAH-WINFIELD E, LO RY. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Infect Immun 1993; 61:5001-5007.
9. HIGHLANDER SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Front Biosci 2001; 6:1128-1150.
10. NARAYANAN S, NAGARAJA T, CHENGAPPA M, STEWART G. Leukotoxins of gram-negative bacteria. Vet Microbiol 2002; 84:337-356.
11. TRIGO F. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. Vet Méx 1991; 22:131-134.
12. JAWORSKI MD, HUNTER DL, WARD AC. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J Vet Diagn Invest 1998; 10:49-55.
13. CARTER GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. Adv Vet Sci 1967; 11:321-379.
14. FEDOROVA ND, HIGHLANDER SK. Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. Infect Immun 1997; 65:2593-2598.
15. ANGEN O, MUTTERS R, CAUGANT DA, OLSEN JE, BISGAARD M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia vari-gena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1999; 49 :67-86.
16. BIBERSTEIN E. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica* In: BAN JR, editor. Methods in Microbiology. New York: Academic Press Inc, 1978; 253-269.
17. FRASER J, LAIRD S, GILMOUR N. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. Res Vet Sci 1982; 32:127-128.
18. BOYCE J, LO R, WILKIE I, ADLER B. *Pasteurella* and *Mannheimia*. In: GILES CL, PRESCOTT JF, SONGER JG, THOEN CO, editors. Pathogenesis of Bacterial Infectious in Animals. Carlton, Australia: Blackwell Publishing, 2004; 273-294.
19. BIBERSTEIN EL, GILLS M, KNIGHT H. Serological types of *Pasteurella hemolytica*. Cornell Vet 1960; 50:283-300.

la liberación de antígenos a través de la mucosa, reduciendo así la colonización de la nasofaringe por parte del microorganismo,¹⁰² ya sea mediante la expresión de antígenos de Mh en vectores virales, que facilitarían la replicación en el tracto respiratorio superior, o la administración oral de dichos antígenos encapsulados en microesferas de alginato,^{102,107} así como el desarrollo mediante ingeniería genética, de plantas para la expresión de antígenos de Mh, a fin de producir vacunas transgénicas comestibles.¹⁰⁸ Estos antígenos derivados de plantas fueron inmunogénicos cuando se inyectaron en conejos y también mediante vacunas orales estimularon una respuesta inmune en la mucosa de becerros.¹⁰⁹

Conclusiones

El impacto de la MnB en la industria bovina, tanto en ganado productor de carne como de leche, ha sido ampliamente comprobado en diversos estudios, tanto en Norteamérica como en Europa;^{1,2} desafortunadamente poco se sabe al respecto en los países de América Latina y en México en particular. Esta enfermedad se considera como la más importante en bovinos productores de carne y la segunda, después de las gastrointestinales, en becerras lecheras.⁷

La MnB se desencadena como consecuencia de un desbalance en la interacción en la tríada constituida por uno o más agentes infecciosos, las defensas del huésped y factores estresantes medioambientales; no obstante esta complejidad etiológica, la mayoría de los estudios coinciden en que el microorganismo involucrado como el principal agente etiológico es la Mh A1.^{2,6,8-10}

Los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria no están del todo esclarecidos, y es posible que existan diferencias entre cepas aisladas de diferentes cuadros neumónicos o de animales sanos.^{6,9,45} Son varios los mecanismos de patogenicidad identificados en Mh, los cuales han sido motivo de análisis y discusión en diversos estudios.^{6,8,14,46,47} Entre ellos destaca particularmente la Lkt como el factor más importante y más ampliamente estudiado, y no obstante la capacidad inmunogénica comprobada en algunos de dichos mecanismos, se considera que la Lkt juega el papel más preponderante en la inducción de una respuesta protectora.^{9,18}

Siguen existiendo enigmas respecto de Mh, particularmente relacionados con aspectos de patogenicidad, virulencia y taxonomía, debido a la variabilidad y la complejidad de las características fenotípicas y genotípicas del género *Mannheimia*, así como por las dificultades en su manipulación genética.⁹ Para una comprensión más amplia de la epidemiología y la importancia de todas las especies de Mh, es necesario

20. BIBERSTEIN EL, GILLS MG. The relation of the antigenic types to the A and T types of *Pasteurella haemolytica*. J Comp Pathol 1962; 72:316-320.
21. FODOR L, VARGA J. Characterization of a new serotype of *P. haemolytica* isolated in Hungary. Res Vet Sci 1988; 44:399.
22. SNEATH PH, STEVENS M. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettiii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1990; 40:148-153.
23. YOUNAN M, FODOR L. Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). Res Vet Sci 1995; 58:98.
24. BLACKALL P, BOJESEN A, CHRISTENSEN H, BISGAARD M. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57:666-674.
25. ANGEN O, QUIRIE M, DONACHIE W, BISGAARD M. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. Vet Microbiol 1999;65:283-290.
26. WRAY B, THOMPSON D. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. Br Vet J 1971; 127:lxvi-lxvii.
27. FRANK G, SMITH P. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. Am J Vet Res 1983; 44:981-985.
28. COLÍN F, JARAMILLO L, AGUILAR F, TRIGO F, MERINO M. Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. Rev Lati-Am Microbiol 1987; 29:231-234.
29. PANDHER K, MURPHY GL, CONFER AW. Identification of immunogenic, surface-exposed outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. Vet Microbiol 1999; 65:215-226.
30. AL-GHAMDI GM, AMES TR, BAKER JC, WALKER R, CHASE CC, FRANK GH *et al.* Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. J Vet Diagn Invest 2000; 12:576-578.
31. EWERS C, LUBKE-BECKER A, WIELER LH. *Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 2004; 117:97-115.
32. JARAMILLO-ARANGO C, HERNANDEZ-CASTRO R, SUAREZ-GUEMES F, MARTINEZ-MAYA J, AGUILAR-ROMERO F, JARAMILLO-MEZA L *et al.* Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico. J Anim Vet Adv 2007; 6:404-409.
33. JARAMILLO-ARANGO C, HERNANDEZ-CASTRO R, SUAREZ-GUEMES F, MARTINEZ-MAYA J, AGUILAR-ROMERO F, JARAMILLO-MEZA L *et al.* Characterization of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudates and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. Res Vet Sci 2008; 84:7-13.
34. BLANCO-VIERA F, TRIGO F, JARAMILLO-MEZA L, AGUILAR-ROMERO F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. Rev Lat-Am Microbiol 1995; 37:121-126.
35. VILLARD L, GAUTHIER D, LACHERETZ A, ABADIE G, GAME Y, MAURIN F *et al.* Serological and molecular comparison of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* strains isolated from wild and domestic ruminants in the French Alps. Vet J 2006; 171:545-550.
36. QUIRIE M, DONACHIE W, GILMOUR N. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. Vet Rec 1986; 119:93-94.
37. ARGUETA G, MERCADO P, TRIGO T. Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Vet Méx 1988; 19:93-97.
38. FRANK G. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the Midwestern United States. American J Vet Res 1982; 43:2035-2037.
39. ANGEN O, AHRENS P, BISGAARD M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. Vet Microbiol 2002; 84:103-114.
40. SISAY T, ZERIHUN A. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the highlands of Wollo, North East Ethiopia. Vet Res Commun 2003; 27:3-14.
41. KIRKAN S, KAYA O. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* strains in pneumonic lungs of sheep in the Aydin Region of Turkey. Turk Vet Anim Sci 2005; 29:491-494.
42. JARAMILLO-ARANGO C, HERNANDEZ-CASTRO R, CAMPUZANO-OCAMPO V, SUAREZ-GUEMES F, DELGADO-GONZALEZ R, TRIGO F. Characterization of *Mannheimia* sp. and *P. multocida* strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico. J Anim Vet Adv 2007; 6:1398-1404.
43. FRANK G. Serological groups among untypable bovine

- isolates of *Pasteurella haemolytica*. J Clin Microbiol 1980; 12:579-582.
44. GENTRY M, CONFER A, HOLLAND S. Comparison of the toxic and antigenic properties of single bovine isolates of *Pasteurella haemolytica* representing five serotypes and an untypable strain. Vet Microbiol 1988; 16:351-367.
 45. HIGHLANDER SK, FEDOROVA ND, DUSEK DM, PANCIERA R, ALVAREZ LE, RINEHART C. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. Infect Immun 2000; 68:3916-3922.
 46. MARCIEL AM, HIGHLANDER SK. Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and cis-acting regulators of leukotoxin transcription. Infect Immun 2001; 69:6231-6239.
 47. JEYASEELAN S, SREEVATSAN S, MAHESWARAN SK. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. Anim Health Res Rev 2002; 3:69-82.
 48. LEITE F, O'BRIEN S, SYLTE MJ, PAGE T, ATAPATTU D, CZUPRYNSKI CJ. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils *in vitro*. Infect Immun 2002; 70:4336-4343.
 49. GIOIA J, QIN X, JIANG H, CLINKENBEARD K, LO R, LIU Y *et al*. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, and *Pasteurellaceae* phylogeny. J Bacteriol 2006; 188:7257-7266.
 50. DESHPANDE MS, AMBAGALA TC, AMBAGALA AP, KEHRLI ME JR., SRIKUMARAN S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. Infect Immun 2002; 70:5058-5064.
 51. SLEIM R. Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. El Cairo, Egypt: Bacteriology Department, Animal Health Research Institute, 2005.
 52. HSUAN SL, KANNAN MS, JEYASEELAN S, PRAKASH YS, SIECK GC, MAHESWARAN SK. *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. Infect Immun 1998; 66:2836-2844.
 53. WANG Z, CLARKE C, CLINKENBEARD K. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. Infect Immun 1998; 66:1885-1890.
 54. BERGGREN K, BALUYUT C, SIMONSON R, BEMRICK W, MAHESWARAN S. Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils. Am J Vet Res 1981; 42:1383-1388.
 55. SHEWEN PE, WILKIE BN. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. Am J Vet Res 1985; 46:1212-1214.
 56. GENTRY MJ, CONFER AW, WEINBERG ED, HOMER JT. Cytotoxin (leukotoxin) production by *Pasteurella haemolytica*: requirement for an iron-containing compound. Am J Vet Res 1986; 47:1919-1923.
 57. LIJ, CLINKENBEARD KD, RITCHEY JW. Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Vet Microbiol 1999; 67:91-97.
 58. JEYASEELAN S, KANNAN MS, BRIGGS RE, THUMBİKAT P, MAHESWARAN SK. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. Infect Immun 2001; 69:6131-6139.
 59. JEYASEELAN S, KANNAN MS, HSUAN SL, SINGH AK, WALSETH TF, MAHESWARAN SK. *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of bovine leukocytes: role of arachidonic acid and its regulation. Microb Pathog 2001; 30:59-69.
 60. SQUIRE P, SMILEY D, CROSKELL R. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. Infect Immun 1984; 45:667-673.
 61. PANDHER K, MURPHY GL. Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. Vet Microbiol 1996; 51:331-341.
 62. PURDY CW, STRAUS DC, STRUCK D, FOSTER GS. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasteurellosis. Am J Vet Res 1993; 54:1637-1647.
 63. MORTON RJ, PANCIERA RJ, FULTON RW, FRANK GH, EWING SA, HOMER JT *et al*. Vaccination of cattle with outer membrane protein-enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. Am J Vet Res 1995; 56:875-879.
 64. KIMURA A, GULIG PA, MCCRACKEN GH JR., LOFTUS TA, HANSEN EJ. A minor high-molecular-weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. Infect Immun 1985; 47:253-259.
 65. IOVANE G, GALDIERO M, VITIELLO M, DE MARTINO L. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins on bovine neutrophils. FEMS Immun Med Microbiol 1998; 20:29-36.
 66. MCBRIDE JW, WOZNIAC EJ, BREWER AW, NAYDAN DK, OSBURN BI. Evidence of *Pasteurella haemolytica* linked immune complex disease in natural and experimental models. Microb Pathog 1999; 26:183-193.
 67. SRINAND S, AMES T, MAHESWARAN S, KING V. Efficacy of various vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle: a meta-analysis. Prev Vet Med 1995; 25:7-17.
 68. SABRI MY, ZAMRI-SAAD M, MUTALIB AR, ISRAFD A, MUNIANDYN. Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. Vet Microbiol 2000; 73:13-23.
 69. PANDHER K, CONFER AW, MURPHY GL. Genetic and immunologic analyses of PlpE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. Infect Immun 1998; 66:5613-5619.
 70. CONFER A, AYALEW S, PANCIERA R, MONTE-LONGO M, WHITWORTH L, HAMMER J. Immunogenicity of recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE and augmentation of a commercial vaccine. Vaccine 2003; 21:2821-2829.
 71. AYALEW S, CONFER A, BLACKWOOD E. Characteri-

- zation of immunodominant and potentially protective epitopes of *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane lipoprotein PlpE. *Infect Immun* 2004; 72:7265-7274.
72. ABDULLAH KM, UDOHEA, SHEWEN PE, MELLORS A. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. *Infect Immun* 1992; 60:56-62.
 73. LEE CW, LO RY, SHEWEN PE, MELLORS A. The detection of the sialoglycoprotease gene and assay for sialoglycoprotease activity among isolates of *Pasteurella haemolytica* A1 strains, serotypes A13, A14, T15 and A16. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 121:199-205.
 74. LEE CW, SHEWEN PE. Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res* 1996; 60:127-132.
 75. LEE CW, SHEWEN PE, CLADMAN WM, CONLON JA, MELLORS A, LO RY. Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves. *Can J Vet Res* 1994; 58:93-98.
 76. NYARKO KA, COOMBER BL, MELLORS A, GENTRY PA. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Vet Microbiol* 1998; 61:81-91.
 77. JARAMILLO L, DIAZ F, HERNANDEZ P, DEBRAY H, TRIGO F, MENDOZA G *et al.* Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology* 2000; 10:31-37.
 78. CONLON J, SHEWEN P, LO RY. Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun* 1991; 59:587-591.
 79. SHEWEN PE, LEE CW, PERETS A, HODGINS DC, BALDWIN K, LO RY. Efficacy of recombinant sialoglycoprotease in protection of cattle against pneumonic challenge with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vaccine* 2003; 21:1901-1906.
 80. STRAUS DC, PURDY CW. *In vivo* production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* A1 in goats after transthoracic challenge. *Infect Immun* 1994; 62:4675-4678.
 81. STRAUS DC, JOLLEY WL, PURDY CW. Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun* 1993; 61:4669-4674.
 82. CONFER AW, PANCIERA RJ, GENTRY MJ, FULTON RW. Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 1986; 47:1853-1857.
 83. JARAMILLO ML, ZENTENO E, TRIGO FJ. Mechanisms of pathogenicity and adhesion in *Pasteurella haemolytica*. *Rev Lat-Am Microbiol* 1999; 41:105-116.
 84. FRANK GH, TABATABAI LB. Neuraminidase activity of *Pasteurella haemolytica* isolates. *Infect Immun* 1981; 32:1119-1122.
 85. STRAUS DC, UNBEHAGEN PJ, PURDY CW. Neuraminidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. *Infect Immun* 1993; 61:253-259.
 86. POULSEN D, MOSIER D, CLINKENBEARD K, CONFER A. Direct effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide of bovine pulmonary endothelial cells *in vitro*. *Am J Vet Res* 1989; 50:1633-1637.
 87. POULSEN D, CONFER A, CLINKENBEARD K, MOSIER D. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from a neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Vet Res* 1990; 51:1635-1639.
 88. LAFLEUR RL, ABRAHAMSEN MS, MAHESWARAN SK. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1998; 66:4087-4092.
 89. LAFLEUR RL, MALAZDREWICH C, JEYASEELAN S, BLEIFIELD E, ABRAHAMSEN MS, MAHESWARAN SK. Lipopolysaccharide enhances cytolytic and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog* 2001; 30:347-357.
 90. KEHRENBURG C, SCHULZE-TANZIL G, MARTEL J-L, CHASLUS-DANCLA E, SCHWARZ S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res* 2001; 32:323-339.
 91. OBERHOFER T. Comparison of the API 20E and Oxi/Ferm Systems in identification of nonfermentative and oxidase-positive fermentative bacteria. *J Clin Microbiol* 1979; 9:220-226.
 92. SWANSON E, COLLINS M. Use of the API 20E system to identify veterinary Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1980; 12:10-14.
 93. COLLINS M, SWANSON E. Use of the API 20E system to identify non-enterobacteriaceae from veterinary medical sources. *Am J Vet Res* 1981; 42:1269-1273.
 94. ERASMUS J. The usefulness of the API 20E classification system in the identification of *Actinobacillus actinomycetem comitans*, *Actinobacillus seminis* and *Pasteurella haemolytica*. *Onderst J Vet Res* 1983; 50: 97-99.
 95. MASLOW J, MULLIGAN M. Molecular Epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993:153-164.
 96. VERSALOVIC J, LUPSKI J. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol* 2002; 10:15-21.
 97. CHASLUS-DANCLA E, LESAGE-DECAUSES MC, LEROY-SETRIN S, MARTEL JL, COUDERT P, LAFONT JP. Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. *Vet Microbiol* 1996; 52:91-102.
 98. POULSEN LL, REINERT TM, SAND RL, BISGAARD M, CHRISTENSEN H, OLSEN JE *et al.* Occurrence of haemolytic *Mannheimia* spp. in apparently healthy sheep in Norway. *Acta Vet Scand* 2006; 47:70.
 99. DEROSA DC, MECHOR GD, STAATS JJ, CHENGAPPA MM, SHRYOCK TR. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal

- swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J Clin Microbiol* 2000; 38:327-332.
100. LIU S-L, SCHRYVERS A, SANDERSON K, JOHNSTON R. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *J Bacteriol* 1999; 181:6747-6755.
 101. ALLEN JW, VIEL L, BATEMAN KG, ROSENDAL S, SHEWEN PE, PHYSICK-SHEARD P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can J Vet Res* 1991; 55:341-346.
 102. RICE J, CARRASCO-MEDINA L, HODGINS D, SHEWEN P. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 2008; 8 117-128.
 103. BOWLAND SL, SHEWEN PE. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J* 2000; 41:33-48.
 104. WILKIE BN, MARKHAM RJ, SHEWEN PE. Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *Am J Vet Res* 1980; 41:1773-1778.
 105. CONFER AW, PANCIERA RJ, FULTON RW, GENTRY MJ, RUMMAGE JA. Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica* on resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Am J Vet Res* 1985; 46:342-347.
 106. PANCIERA RJ, CORSTVET RE, CONFER AW, GRESHAM CN. Bovine pneumonic pasteurellosis: effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am J Vet Res* 1984; 45:2538-2542.
 107. BOWERSOCK TL, HOGENESCH H, SUCKOW M, GUIMOND P, MARTIN S, BORIE D *et al.* Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres. *Vaccine* 1999; 17:1804-1811.
 108. LEE RW, STROMMER J, HODGINS D, SHEWEN PE, NIU Y, LO RY. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect Immun* 2001; 69:5786-5793.
 109. LO RY. Development of transgenic alfalfa expressing antigens of *Mannheimia hemolytica* as an oral vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis. Proceedings of the International Pasteurellaceae Society Conference 2008; 2008 Oct 12-15; Sorrento, Italia. Sorrento, Italia: International Pasteurellaceae Society, 2008: S:11.