



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y FORESTALES**

**MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
CON OPCIÓN TERMINAL EN EL ÁREA PECUARIA**

TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS ASOCIADOS A CASOS
CLÍNICOS DE QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA (QIB) EN DOS
CUENCAS LECHERAS DE MICHOACÁN**

QUE PRESENTA

ANA MARÍA RÍOS ALANÍS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO**

**CO-DIRECTOR
DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA**

TARÍMBARO, MICHOACÁN, MÉXICO. FEBRERO 2017



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

**MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
CON OPCIÓN TERMINAL EN EL ÁREA PECUARIA**

TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS ASOCIADOS A CASOS
CLÍNICOS DE QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA (QIB) EN DOS
CUENCAS LECHERAS DE MICHOACÁN**

QUE PRESENTA

ANA MARÍA RÍOS ALANÍS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR DE TESIS

**DR. EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
JOSÉ HERRERA CAMACHO**

CO-DIRECTOR

**DR. EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS
JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA**

**DRA. SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVIA
DR. GERARDO RODRÍGUEZ ALVARADO
DR. JOSÉ C. SEGURA CORREA**

TARÍMBARO, MICHOACÁN, MÉXICO. 2017

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA.....	5
2.1 Distribución de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB).....	5
2.2 Factores de riesgo asociados a QIB	6
2.3 Cadena epidemiológica.....	7
2.4 Identificación del agente causal de QIB	9
2.5 <i>Moraxella bovis</i> agente causal de QIB y factores estructurales que favorecen su virulencia	10
2.6 Prevención de QIB mediante inmunización	11
III. MARCO DESCRIPTIVO DE LA ZONA DE ESTUDIO	14
Hipótesis	17
Objetivos	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Procedimiento diagnóstico	19
4.2 Selección de los animales y toma de muestras	20
4.3 Procesamiento de muestras en el laboratorio	21
4.4 Cultivo de las muestras oculares en medio sólido	21
4.5 Cultivo de colonias en medio líquido.....	22
4.6 Tinción de Gram.....	23
4.7 Antibiograma.....	24
4.8 Extracción de ADN.....	25
4.9 Identificación de los aislamientos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (ARNr 16S).....	26
4.10 Secuenciación de los productos del gen ARNr 16S amplificados por PCR	28
4.11 Comparación de la secuencia parcial del ARNr 16S de los aislados con las disponibles en la base de datos del GenBank.....	28
4.12 Análisis estadístico.....	28
V. RESULTADOS.....	29

5.1 Número de animales y de hatos muestreados por localidad.....	29
5.2 Sistemas de producción en los 11 hatos muestreados	29
5.3 Categorización de los bovinos con lesiones oculares	30
5.4 Obtención de muestras oculares.....	30
5.5 Identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas de las diferentes colonias	32
5.6 Microorganismos identificados de los aislados oculares de bovinos con lesiones características de QIB.....	33
5.7 Sensibilidad antimicrobiana	37
VI. DISCUSIÓN	41
VII. CONCLUSIONES	49
VIII.ANEXOS.....	50
8.1 Cuestionario de casos con Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina.....	50
8.2 Expediente clínico de casos con Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina.....	51
8.3 Preparación de medios de cultivo	53
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La mosca como vector de <i>M. bovis</i> (A) y su adherencia a la córnea por medio de las fimbrias (B).....	7
Figura 2. Signología ocular de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. A) Epífora, B) Opacidad corneal, y C) Ulcera corneal.....	8
Figura 3. <i>Moraxella bovis</i> . En la figura se presentan las fimbrias que son elementos importantes para el establecimiento de la QIB.	10
Figura 4. Bacterina de <i>Moraxella bovis</i> disponible en el mercado (A) y su administración inyectable (B).	12
Figura 5. Mapa de Michoacán indicando en color azul las regiones lecheras.	15
Figura 6. Ubicación de las localidades donde se realizó la toma de muestras oculares.....	19
Figura 7. Toma de muestra ocular con hisopo (A y B) y colocación en hielera para su transporte (C).	21
Figura 8. Cultivo de muestra ocular en agar sangre (A), incubación (B) y posterior revisión del crecimiento de colonias (C).	22
Figura 9. Cultivo de colonias en medio líquido. Toma de la colonia con palillo (A) y su cultivo en caldo LB (B).	23
Figura 10. Realización de frotis para tinción Gram a partir del cultivo líquido (A y B). Cocobacilos Gram (–), vista microscópica (C).	24
Figura 11. Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana de los aislados bacterianos asociados a QIB. Sensidiscos con 12 antimicrobianos (A) y medición del halo de inhibición con regla en mm (B).	25
Figura 12. Obtención del ADN de los aislados bacterianos asociados a QIB. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.	26
Figura 13. Amplificación de una región del ARNr 16S de los aislados bacterianos asociados a QIB. Electroforesis de los productos amplificados por PCR. Se muestra el marcador de tamaño molecular (M) y los productos de amplificación de dos aislados bacterianos (carriles 1 y 3).....	27

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inventario de bovinos productores de leche de las regiones de estudio	17
Tabla 2. Sistemas de producción, número animales y hatos muestreados por localidad.	29
Tabla 3. Número de muestras obtenidas del cultivo de aislados oculares en Agar sangre.	31
Tabla 4. Colonias seleccionadas de acuerdo a sus características morfológicas después de 24 h de cultivo a 37 °C y resultados de la tinción Gram.....	32
Tabla 5. Microorganismos identificados mediante la secuenciación del ARNr 16S de los 38 aislados asociados a QIB.	34
Tabla 6. Frecuencia de aislamiento de la microbiota asociada a QIB.....	35
Tabla 7. Sensibilidad antimicrobiana de los aislados asociados a QIB.....	38

RESUMEN

La enfermedad ocular más común que afecta a los bovinos es la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB), la cual se ha asociado a la bacteria *Moraxella bovis*. En el presente estudio se estimó la prevalencia de QIB en las cuencas lecheras del altiplano Michoacano y la región de la Ciénega y se identificó el agente causal de la enfermedad. Se obtuvieron muestras oculares de 17 bovinos que presentaban QIB de una población de 761 cabezas. De estas muestras se obtuvieron 38 aislados, los cuales se caracterizaron mediante tinción de Gram y prueba de sensibilidad a antibióticos. La identificación de los aislados se realizó mediante la amplificación por PCR de una región del gen ribosomal 16S, a la cual se le determinó la secuencia de nucleótidos y se usó para realizar comparaciones en la base GenBank. La proporción de animales con QIB fue 2.23% y se identificó a la microbiota bacteriana asociada a ella. Las especies bacterianas identificadas fueron *Staphylococcus saprophyticus*, *S. agnetis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. suis*, *S. uberis*, *Enterococcus mundtii*, *Bacillus aerius*, *B. toyonensis*, *B. pumilus*, *Rhotia nasimurium*, *Arthobacter gandavensis*, *A. luteolus*, *Peptoniphilus indolicus*, *Corynebacterium Aquilae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. zhaodongensis*, *Mannheimia granulomatis*, *Acinetobacter schindler*, *Enterobacter mori*, *Moraxella equi* y *M. bovoculi*. Hasta nuestro conocimiento el presente estudio es el primero de este tipo que se ha realizado en México, por lo que es necesario más investigación para estimar la proporción de animales con QIB y la microbiota asociada a ella.

Palabras clave: Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB); Ojo rosado; *Moraxella bovis*; *Moraxella bovoculi*; Flora bacteriana en QIB.

ABSTRACT

The most common ocular disease affecting cattle is the Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (IBK), which has been associated with *Moraxella bovis*. In this study, the IBK prevalence was assessed in two dairy regions from Michoacan (Altiplano and The Cienega) and the causal agent of the disease was identified. A total of 761 individuals were analyzed and only 17 showed IBK. Ocular samples were obtained from animal with IBK and 38 bacterial isolates were obtained, which were characterized by Gram stain and antibiotic sensitivity. Identification of the bacterial isolates was performed by PCR amplification of a region of the 16S ribosomal gene, the nucleotide sequence was determined and it was used to carried out comparisons in the GenBank. The animals proportion with IBK was 2.23% and the bacterial microbiota associated with IBK included *Staphylococcus saprophyticus*, *S. agnetis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. suis*, *S. uberis*, *Enterococcus mundii*, *Bacillus aerius*, *B. toyonensis*, *B. pumilus*, *Rhotia nasimurium*, *Arthobacter gandavensis*, *A. luteolus*, *Peptoniphilus indolicus*, *Corynebacterium Aquilae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. zhaodongensis*, *Mannheimia granulomatis*, *Acinetobacter schindler*, *Enterobacter mori*, *Moraxella equi* and *M. bovoculi*. To our knowledge, the present study is the first of its kind in Mexico, however it is necessary perform more research to estimate the animals proportion with IBK and the microbiota associated to this disease.

I. INTRODUCCIÓN

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una enfermedad causada principalmente por la bacteria Gram negativa *Moraxella bovis*, es de distribución mundial y provoca pérdidas económicas elevadas asociadas al tratamiento de los animales afectados además de afectar su productividad; constituyendo un serio problema sanitario que afecta al sector ganadero.

Algunos estudios han estimado que se pierden entre 10 y 20 kg de carne/animal (Prieto *et al.*, 2008; Zoco *et al.*, 2010; Martirena y Turrens, 2013). En países como Australia en 1979 y USA en 1993 se estimaron pérdidas cercanas a los 22 y 150 millones de dólares anuales respectivamente, por causas directas e indirectas de esta enfermedad, con un promedio de aproximadamente 13 dólares por animal afectado (Kirkpatrick y Lalmar, 1997; Rodríguez *et al.*, 2006). En USA se ven afectadas más de 10 millones de cabezas de ganado anualmente (Hare *et al.*, 2008), estimándose pérdidas de más de 200 millones anuales (Addison, 2011). No obstante los esfuerzos realizados por evitar su presentación al inmunizar a los animales como medida preventiva, no se ha logrado reducir el número de animales afectados. Prieto *et al* (2008) reportaron que el rango de protección de las vacunas comerciales oscila entre el 20% y 50%. La principal razón por la cual no se tiene éxito con la inmunización se relaciona con la variabilidad en la estructura de la pared celular de *M. bovis*. Asociado a que las vacunas disponibles en el mercado derivan de cepas específicas que no garantizan la protección contra la enfermedad, se requiere que las vacunas contengan cepas regionales, con lo que se esperaría obtener mayor inmunidad al presentarse el agente causal y disminuir el porcentaje de

animales afectados y como consecuencia las pérdidas económicas, aunado a otras medidas preventivas (Brown *et al.*, 1998; Giraudo, 2005).

En México aunque no se ha documentado sobre la investigación del agente causal de QIB, se tiene conocimiento de su existencia al observar bovinos con lesiones oculares características de la enfermedad, similar situación prevalece en Michoacán.

En el presente estudio se identificó la microflora ocular asociada con QIB, siendo *Staphylococcus* el género más prevalente en los casos clínicos observados en dos Cuencas Lecheras de Michoacán, una localizada en el altiplano (Uruétaro), y la otra en la región de la Ciénega (Marcos Castellanos, Sahuayo, Emiliano Zapata y Villa Madero) durante los meses de julio a diciembre de 2015.

II. EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA

2.1 Distribución de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB)

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina fue descrita por primera vez en 1889 por Billings en un rebaño en Nebraska, USA, como un cuadro oftálmico contagioso caracterizado por lagrimeo, fotofobia, úlceras corneales y opacidad. En Argentina, Zabala y Voges la describieron en 1901. Está enfermedad es ampliamente distribuida en diversas regiones de distintos continentes y constituye un serio problema que afecta al sector ganadero (Brown *et al.*, 1998).

En México es una enfermedad enzoótica en las diferentes regiones geográficas y su aparición se asocia a las condiciones ambientales y a la presencia estacional de vectores; en los estados del norte interviene además la intensa radiación solar, en el altiplano son los vectores y las tolvaneras, y en los estados del sur influye la presencia de vectores (Gasque, 2008).

Existen pocas publicaciones de esta enfermedad en la República Mexicana, se refieren solo dos estudios, uno de ellos realizado por Infante *et al.* (2000), quienes identificaron un brote de QIB en Tamaulipas en 1977 provocado por *M. bovis* en una explotación lechera de doble propósito, con 200 cabezas de ganado Holstein, Cebú, Suizo y sus cruza, presentándose 83 casos que correspondían al 42% de la población. Para el control del brote se disminuyó el número de moscas mediante gasóleo con la intención de evitar la transmisión de la enfermedad. El segundo estudio es del año 2010, en él se publicaron los resultados obtenidos de un estudio comparativo al administrar florfenicol vía ocular y vía parenteral a 64 bovinos

afectados con QIB en el municipio de Manuel Doblado, Guanajuato (Zamora *et al.*, 2010). En ambos casos no se identificó la bacteria asociada a los brotes.

2.2 Factores de riesgo asociados a QIB

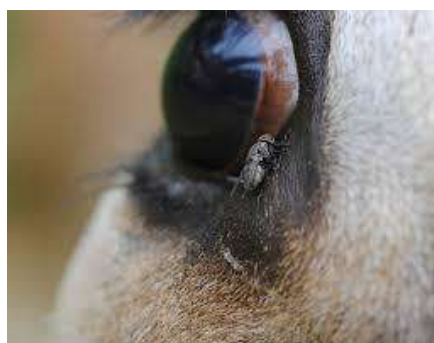
Existen varios factores que favorecen la presentación de QIB, tales como la edad, raza, agentes mecánicos y biológicos, la estación del año, sistema de producción, condiciones ambientales, el estrés y la deficiencia de vitamina A. Con respecto a la edad, es más frecuente en los animales jóvenes, de 45 días a 1 año (Gasque, 2008).

Los animales cuyos párpados son despigmentados son más sensibles, por ello afecta más al ganado europeo que al cebuino, es común observar esta enfermedad en las razas Hereford, Charolais, Holstein, Chianina, Simental y Criollo, así como en aquellos animales que están bajo condiciones de pastoreo (Baptista, 1979; Caspari *et al.*, 1980; Gasque, 2008).

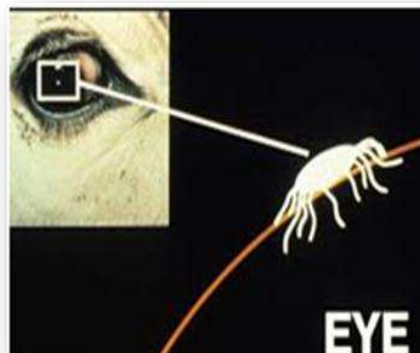
Los agentes mecánicos incluyen pastos altos, alimentos en batea con polvillo, semillas, polen y el polvo, pero el vector biológico que más influye es la mosca. Entre los factores ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad esta el aumento de intensidad de los rayos solares, la humedad relativa baja y la temperatura elevada; razón por la cual la incidencia es más alta en zonas áridas y en las estaciones de primavera y verano; sin embargo, en invierno se han observado brotes severos cuando el ganado se encuentra confinado en establos cerrados (Odeón *et al.*, 2006; Gasque, 2008).

2.3 Cadena epidemiológica

La principal bacteria responsable de la QIB es *Moraxella bovis*, la cual vive en el suelo o en las plantas y es depositada en el ojo mediante el viento, las patas de las moscas [considerada como un factor importante en la transmisión ya que puede vivir hasta tres días en ella (Figura 1A) (Blood y Radostits, 1992; Infante *et al.*, 2000)], o por contacto directo de animales portadores (Gerhardt *et al.*, 1982). Esta invade las glándulas lagrimales y el tarso; además, aquellas bacterias que poseen fimbrias, que son pili tipo IV, se adhieren a la capa externa de la córnea (Figura 1B) (Minatel y Corbelleni, 2007), provocando daño a la integridad de ésta, además de que secretan una citotoxina β -hemolítica que afecta la córnea y a los leucocitos (Postma *et al.*, 2008). En las primeras 12 h se observan erosiones microscópicas en la córnea, sin evidencia de una respuesta inflamatoria (Bretschneider y Pérez, 1996).



A



B

Figura 1. La mosca como vector de *M. bovis* (A) y su adherencia a la córnea por medio de las fimbrias (B).

Fuentes: (A) (Serrano, 2016) y (B) <http://www.stopcattlepinkeye.com/>

Los signos clínicos tempranos son epifora (Figura 2A), fotofobia y blefaroespasmos, seguido por la opacidad en el centro de la córnea (Figura 2B), que puede progresar a ulceración (Figura 2C), causando ceguera temporal o permanente por descemetocel y ruptura de la córnea (Blood y Radostits, 1992; Minatel y Corbelline, 2007; Odeón *et al.*, 2006). Se ha descrito que en el transcurso de un mes el 100% del ganado podría presentar la signología (Baptista, 1979).



A

B

C

Figura 2. Signología ocular de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. A) Epifora, B) Opacidad corneal, y C) Úlcera corneal.

Fuentes: (A) cattletoday.com:

(B) <https://web.extension.illinois.edu/oardc/downloads/43489.pdf>

(C) <http://informedfarmers.com/new-forest-eye-in-beef-cattle/>

El diagnóstico se obtiene mediante la observación de los signos clínicos, la lesión patognomónica es la úlcera en el centro de la córnea y es necesaria la confirmación en el laboratorio para conocer el tipo de cepa actuante, el espectro antigénico y la sensibilidad a los antibióticos (Turquieto *et al.*, 2008).

2.4 Identificación del agente causal de QIB

La bacteria *M. bovis* se ha aislado en el 85% de los animales enfermos y a partir de ella se puede reproducir la enfermedad en 80 a 90% (Gasque, 2008), la presentación es aguda y tiende a difundirse rápidamente (Infante *et al.*, 2000). Si bien, *M. bovis* es el microorganismo más común y que provoca las lesiones más severas, se han identificado otros agentes patógenos como el *Herpesvirus bovino 1* (BoHV-1), *Branhamella ovis*, *Chlamydia*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pasteurella sp.*, que pueden agravar la enfermedad (Blood y Radostits, 1992; Gasque, 2008; Turkieto *et al.*, 2008).

Durante años se ha considerado a *M. bovis* como el principal agente etiológico de QIB. Sin embargo, en 2002 se aisló a *M. bovoculi* de animales afectados en USA (Angelos *et al.*, 2007c), esta misma especie fue aislada en Brasil por Libardoni *et al.* (2012) y en Uruguay por Sosa y Zunino (2013). Se ha planteado la asociación de otra especie del género *Moraxella*, *M. ovis*, sugiriendo que tanto *M. bovoculi* y *M. ovis* tienen un rol en la patogenicidad (Acquistapace, 2014).

Sosa y Zunino (2013), presentaron un estudio que permitió identificar la diversidad genética mediante PCR de una colección de cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* aisladas de casos de QIB del año 1983 a 2009 en Uruguay. De 51 casos analizados, en 25 de ellos se identificó a *M. bovis* y en 26 casos a *M. bovoculi*.

2.5 *Moraxella bovis* agente causal de QIB y factores estructurales que favorecen su virulencia

M. bovis es un cocobacilo, que pertenece a la familia *Moraxellaceae*, clase Proteobacteria (Baptista, 1979); se considera un patógeno oportunista, identificado en la conjuntiva y secreciones nasales de bovinos sin signología clínica o historia clínica de infección ocular (Pugh *et al.*, 1986).

Entre los factores que se asocian a la patogenicidad de *Moraxella* spp., se encuentran la expresión de fimbrias, lipopolisacáridos, proteínas de membrana externa (OMP), hemolisinas, fosfolipasas, sistemas de adquisición de hierro y enzimas proteolíticas (Postma *et al.*, 2008).

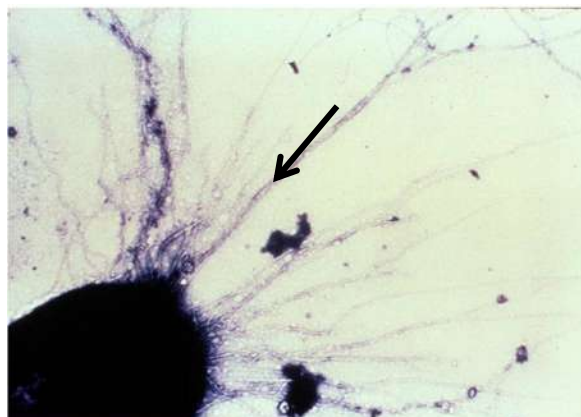


Figura 3. *Moraxella bovis*. En la figura se presentan las fimbrias que son elementos importantes para el establecimiento de la QIB.

Fuente: <http://www.stopcattlepinkeye.com/>

Las fimbrias (Figura 3) son el principal factor de virulencia para iniciar la colonización del huésped, debido a que son las estructuras que permiten la adherencia de la bacteria, en su ausencia no se establece la infección ocular, y se han descrito dos tipos, la tipo I y la Q (Atwell *et al.*, 1994). Las fimbrias tipo Q son las

que permiten la adherencia de la bacteria a la córnea bovina y las tipo I permiten a la bacteria mantenerse adherida y establecer la infección (Fulks *et al.*, 1990). Los lipopolisacáridos de la bacteria estimulan a los macrófagos, células endoteliales y linfocitos, responsables de la liberación de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, estas a su vez promueven la adhesión de neutrófilos y monocitos del endotelio vascular, activando y atrayendo células inflamatorias y mediadores de choque endotóxico (Cortinas, 2014).

Las hemolisinas son una familia de exotoxinas dependientes de calcio que forman poros en las membranas citoplasmáticas de las células epiteliales de la córnea, eritrocitos y leucocitos ocasionando flujo de potasio, desequilibrio osmótico y lisis de las membranas (Angelos *et al.*, 2003). Frank y Gerber (1981) refieren una gran variedad de enzimas hidrolíticas presentes en *M. bovis*, entre ellas esterasas C4, esterasas-lipasas C8, lipasa C4, fosfoamidases, fosfatasas y gelatinasas.

M. bovis posee la habilidad de adquirir hierro desde el huésped para sintetizar proteínas y ADN, y debido a que su concentración extracelular es baja, la bacteria al igual que otras especies bacterianas sintetiza y libera una molécula sideróforo, estas moléculas remueven el hierro contenido en las proteínas del huésped para incorporarlo a la célula bacteriana. Se sugiere que la OMP *IrpA* de *M. bovis* está involucrada en el sistema de adquisición de hierro (Cortinas, 2014).

2.6 Prevención de QIB mediante inmunización

Rochedo y Gil (2003) indican “La forma más eficiente para controlar la QIB es a través del uso de las vacunas que sean elaboradas con antígenos fimbriales”

(Figura 4). En 1982 se desarrolló una vacuna con estos antígenos (Gil *et al.*, 1982), y su empleo mostró un nivel de protección de 83% para el reto experimental. Esta vacuna se ha utilizado en Brasil, Uruguay y Argentina desde mediados de los años 80. Sin embargo, los estudios realizados en diversas partes del mundo revelaron la existencia de diferentes serotipos de fimbrias de *M. bovis* (Lepper y Hermans, 1986; Moore y Rutter, 1987).



A



B

Figura 4. Bacterina de *Moraxella bovis* disponible en el mercado (A) y su administración inyectable (B).

Fuentes: (A) Piliguard® moraxella bovis
(B) (CONtexto Ganadero, 2016).

La administración de las cepas no prevalentes en la región, con la finalidad de conferir inmunidad (Figura 4B), así como la diversidad antigénica del agente etiológico y la ausencia de estudios epidemiológicos podría explicar los frecuentes fracasos de la administración de vacunas al no prevenir la presentación de la QIB (Rochedo y Gil, 2003). Ante esta situación surgió la necesidad de conocer y controlar las características antigénicas de las cepas prevalentes en la región destinada a la

producción de vacunas eficaces, motivo por el cual se han realizado diversas investigaciones, en diferentes países para determinar la diversidad de cepas, la caracterización de las mismas y la comparación de las cepas circulantes con las empleadas en la elaboración de vacunas (Zunino y Sosa, 2008).

De igual forma y esperando un alto índice de inmunoprotección se realizan investigaciones para emplear las hemolisinas de *Moraxella spp*, considerando que son de naturaleza proteica, éstas poseen la capacidad para actuar como antígenos en vacunas. Al respecto, Angelos y Ball (2007d) demostraron la homogeneidad genética de las citotoxinas de *M. bovis* de cepas de diferentes orígenes geográficos, ante este hecho, se ha pensado que una vacuna basada en citotoxinas puede prevenir la QIB ocasionada por múltiples cepas de *M. bovis*.

Otro punto que refuerza lo anteriormente expuesto, se basa en la observación del ganado recuperado de casos de QIB, estos animales producen anticuerpos anti-hemolisinas que pueden neutralizar las hemolisinas de varias cepas de *M. bovis*. A su vez el ganado que ha sido inmunizado con hemolisinas de *M. bovis* resultó protegido contra desafíos heterólogos (Sosa, 2013).

III. MARCO DESCRIPTIVO DE LA ZONA DE ESTUDIO

El estado de Michoacán presenta una división administrativa conformada por 13 Distritos de Desarrollo Rural (DDR) distribuidos regionalmente en 5 regiones ganaderas, esta agrupación se conformó considerando el clima, el sistema de producción, la raza de bovinos, la actividad zootécnica, la orientación comercial, los sistemas de manejo de praderas o agostaderos entre otros factores, estas regiones ganaderas son:

La Región Sistema Vaca-Becerro Trópico Subhúmedo

Región Sistema Doble Propósito del Valle de Apatzingán

La Cuenca Lechera de la Ciénega de Chapala

La Región Ganadera del Altiplano Michoacano

Región Ganadera del Bajío Michoacano (Figura 5)

La producción de leche se desarrolla principalmente en Cuencas Lecheras localizadas en la Región de la Ciénega y el Altiplano Michoacano (Figura 5), así como en el Valle de Apatzingán en sistemas doble propósito.

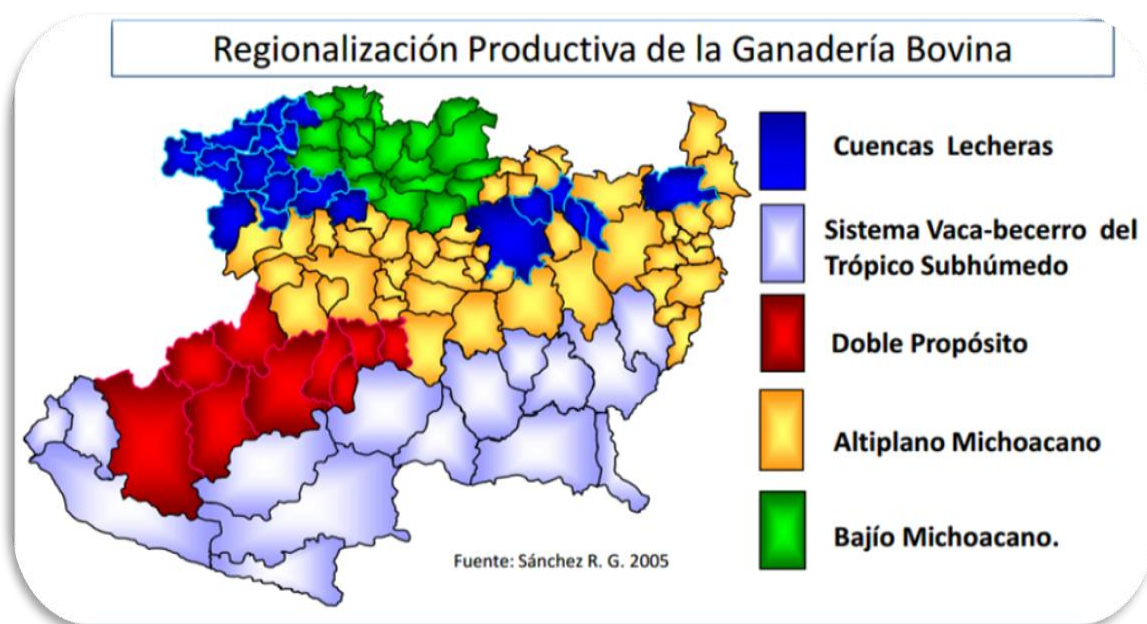


Figura 5. Mapa de Michoacán indicando en color azul las regiones lecheras.

Región Ganadera del Altiplano Michoacano

Esta Región se localiza en la zona centro y norte del estado de Michoacán, los climas dominantes son: el templado subhúmedo, el templado húmedo y una franja de transición en el límite sur de clima cálido subhúmedo. Esta zona comprende el área de influencia del DDR 092 Morelia, el DDR 087 Uruapan, DDR 091 Pátzcuaro excepto el municipio de Turicato, el DDR 094 Zitácuaro, así como los municipios de Tocuambo y Los Reyes del DDR 088 Zamora.

Las unidades de producción tienden a ser pequeñas y son manejadas por mano de obra familiar. De acuerdo con el inventario ganadero 2004 el 28% del ganado de la región son cruza de criollo con Holstein, el 7% es Holstein, el 6% cruza de Holstein con Cebú. El tamaño promedio del hato es de 17 cabezas.

La región ganadera del Altiplano Michoacano cuenta con el 24% del inventario ganadero estatal y produce el 25% de la producción de leche del Estado, el DDR Morelia es el mayor productor de toda la zona con una participación en producción del 48%. El área que integra la Cuenca Lechera Morelia-Queréndaro pertenece al Altiplano Michoacano ubicándose al noreste del estado e involucra a los municipios de Morelia, Tarímbaro, Álvaro Obregón, Indaparapeo y Queréndaro (Figura 5).

Cuenca Lechera de la Ciénega de Chapala

Se localiza en la zona noroeste del estado de Michoacán en los límites con el estado de Jalisco. Los climas dominantes son el Cálido Subhúmedo y Templado Subhúmedo. Esta cuenca comprende toda el área de influencia del DDR 089 Sahuayo, los municipios de Ixtlán, Chavinda; Tangamandapio, Cotija, Tinguindín, Jacona, Tangancícuaro y Chilchota correspondientes al DDR 088 Zamora, así como el municipio de Tanhuato del DDR 090 La Piedad. También incluye a los municipios de Venustiano Carranza, Cotija, Pajacuarán, Villahermosa, Villamar, Jiquilpan, Sahuayo y Marcos Castellanos. En esta cuenca se localiza el 12% del inventario ganadero estatal, cuenta con 113,294 cabezas de ganado distribuidas en 2,895 hatos según informe del comité estatal para el fomento y protección pecuaria de Michoacán, siendo el tamaño del hato promedio de 43 cabezas. La ganadería de esta cuenca posee una alta especialización en la producción de leche, contribuyendo con el 35% de la producción de leche del Estado. predominando en un 75% el ganado de raza Holstein y sus cruas (Sánchez y Sánchez, 2005).

En entrevista el 1 de marzo de 2014 con Ramón Cano Vega, secretario de Desarrollo Rural de Michoacán, refiere que el municipio de Marcos Castellanos

(cuenca lechera de la Ciénega de Chapala) es el principal productor de leche al generar 36,857,670 litros al año, y el segundo lugar lo ocupa Tarímbaro (Región ganadera del altiplano michoacano) con 12,160,635 litros, cuyas localidades lecheras más importantes son Téjaro y Uruétaro. En la tabla 1 se presenta el inventario de bovinos de las principales regiones de estas dos zonas lecheras.

Tabla 1. Inventario de bovinos productores de leche de las regiones de estudio

Uruétaro y Téjaro	Villa Madero	Marcos Castellanos	Emiliano Zapata *	Sahuayo
667	4125	14387	539	1814

Censo Agropecuario 2007

*Sagarpa 2014

Hipótesis

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina en las cuencas lecheras del altiplano Michoacano y la región de la Ciénega está asociada a la presencia de la bacteria *Moraxella bovis*.

Objetivos

Objetivo general

Estimar la prevalencia de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina en las cuencas lecheras del altiplano Michoacano y la región de la Ciénega e identificar al agente causal de la enfermedad.

Objetivos específicos

1. Estimar la prevalencia de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina en hatos de bovinos en las cuencas lecheras del altiplano Michoacano y la región de la Ciénega del estado de Michoacán.
2. Identificar al agente causal de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina en animales con lesiones oculares.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Procedimiento diagnóstico

El periodo de muestreo se llevó a cabo del mes de julio al mes de diciembre del 2015 en la localidad de Uruétaro, comunidad perteneciente al Valle Morelia-Queréndaro, y en las localidades de Marcos Castellanos, Sahuayo y Emiliano Zapata, pertenecientes a la cuenca lechera de la Ciénega de Chapala y en Villa Madero, pertenecientes a Michoacán (Figura 6).

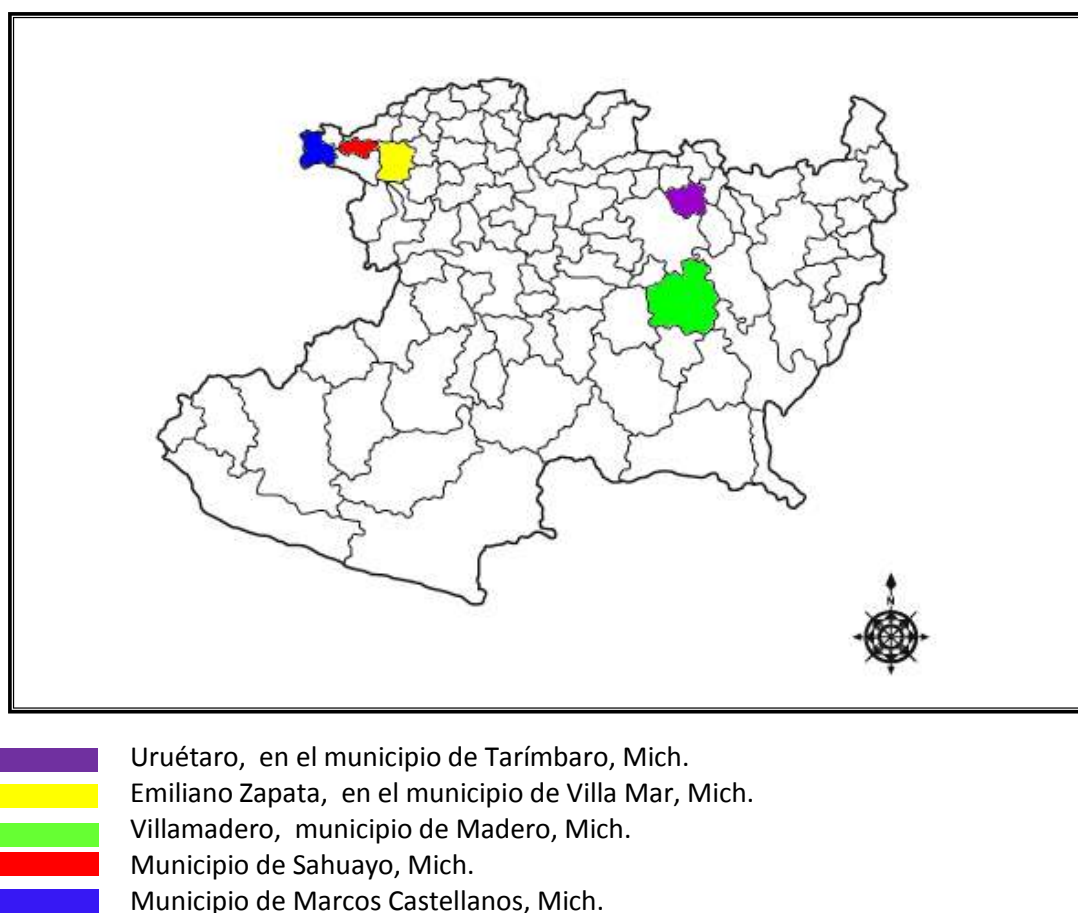


Figura 6. Ubicación de las localidades donde se realizó la toma de muestras oculares.

4.2 Selección de los animales y toma de muestras

Se realizaron visitas y observación de los animales en 11 hatos, seleccionando aquellos animales con signología sugerente de QIB como epifora, conjuntivitis, opacidad corneal, blefaroespasmo, fotofobia y úlcera corneal. Algunos bovinos presentaron lesiones en ambos ojos, en otros casos sólo en un ojo. Cabe señalar que ambos ojos fueron muestreados en todos los casos clínicos. Adicionalmente, a los propietarios de cada unidad de producción se les aplicó un cuestionario (Anexo No. 1) para el registro del expediente clínico (Anexo No. 2), lo que permitió identificar a cada uno de los casos clínicos seleccionados.

Se realizó la antisepsia de la región periocular con gasa impregnada con jabón de cloruro de benzalconio al 10%, que se retiró luego con gasa y solución de cloruro de sodio al 0.9%. Las muestras se tomaron usando guantes de exploración estériles de la superficie ventral del ojo, entre el globo ocular y el saco conjuntival con hisopo estéril (Figuras 7A y 7B), siendo depositadas en un tubo con medio de transporte estéril Cary Blair (COPAN Italia S. p. A.). Posteriormente las muestras se colocaron en una hielera con refrigerantes en gel (Figura 7C) para ser transportado al laboratorio.

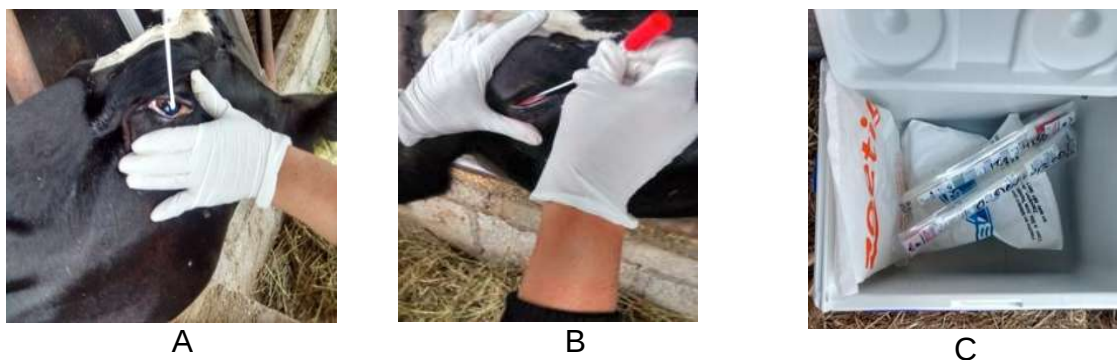


Figura 7. Toma de muestra ocular con hisopo (A y B) y colocación en hielera para su transporte (C).

4.3 Procesamiento de muestras en el laboratorio

Las treinta y cuatro muestras obtenidas en las unidades de producción pecuaria se procesaron en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

4.4 Cultivo de las muestras oculares en medio sólido

En la campana de flujo laminar se tomó el hisopo impregnado de contenido ocular y se distribuyó en agar sangre (Figura 8A) (anexo no.3), posteriormente se incubó a 37 °C por 24 h (Figura 8B).

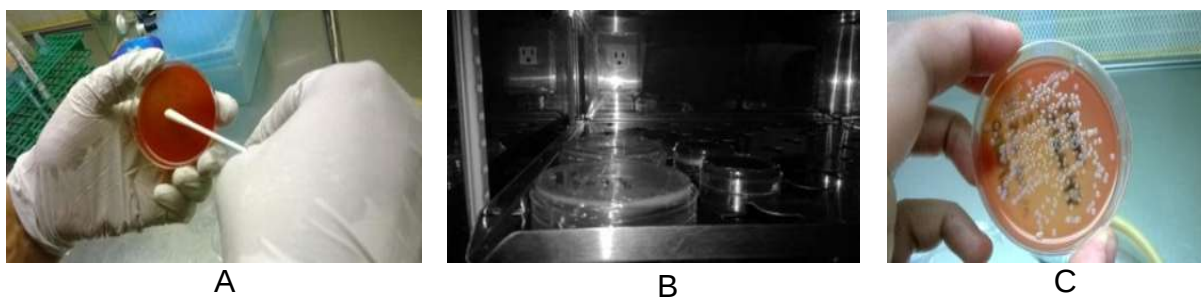


Figura 8. Cultivo de muestra ocular en agar sangre (A), incubación (B) y posterior revisión del crecimiento de colonias (C).

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la observación macroscópica de las colonias formadas (Figura 8C). Se evaluó el tamaño, la forma, los bordes, la superficie, el color, la presencia de hemólisis, se seleccionaron las colonias grises-blanquecinas, redondas, pequeñas, convexas con o sin halo de hemólisis características que pudieran asociarse con *M. bovis*, es preciso mencionar que de una misma caja pudo elegirse más de una colonia por poseer particularidades diferentes a las colonias adyacentes, pero que contaban con algún criterio de inclusión. Las colonias seleccionadas fueron cultivadas toda la noche en caldo Luria Bertani (LB) (Anexo no. 4), y para su conservación se adicionó glicerol al 10% y se almacenaron a -80 °C. Con la finalidad de identificar a cada colonia se le asignó la denominación de muestra (M) y una numeración ascendente iniciando en M1.

4.5 Cultivo de colonias en medio líquido

En la campana de flujo laminar y con el empleo de un palillo estéril se tomó cada colonia y se suspendió en 2.5 ml de caldo LB en un tubo de 15 ml (Figura 9A y

B), mismo que se selló para introducirlo en la incubadora de agitación por 24 h a 37 °C.



Figura 9. Cultivo de colonias en medio líquido. Toma de la colonia con palillo (A) y su cultivo en caldo LB (B).

4.6 Tinción de Gram

A partir de las bacterias cultivadas en medio líquido, se colocó una muestra en una laminilla mediante frotis (Figura 10A y B) para realizar la tinción de Gram con la aplicación secuencial de diferentes soluciones iniciando con cristal violeta, lugol, alcohol cetona y safranina, finalizando con un lavado de la laminilla con agua destilada, misma que se empleó entre cada paso.

La tinción de Gram permitió diferenciar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas (Figura 10C) al observarlas en el microscopio óptico con objetivo 40x (Figura 10).

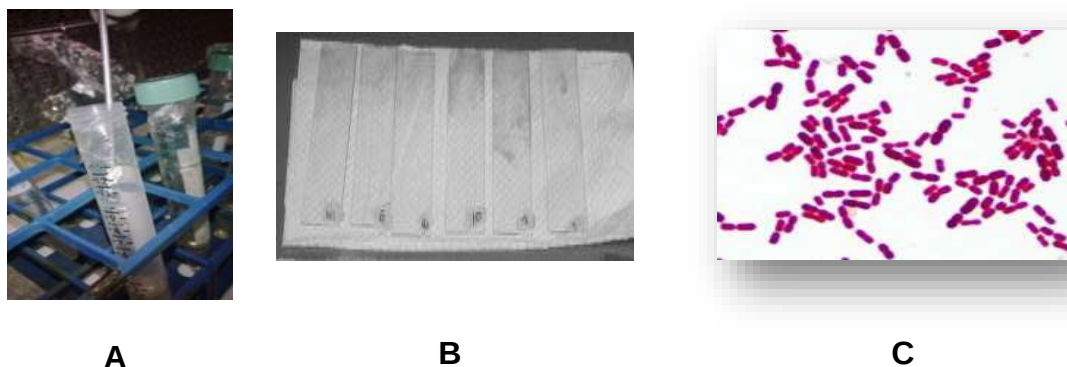


Figura 10. Realización de frotis para tinción Gram a partir del cultivo líquido (A y B).
Cocobacilos Gram (–), vista microscópica (C).

4.7 Antibiograma

Las bacterias cultivadas en caldo LB (24 h, 37 °C) se utilizaron para realizar las pruebas de sensibilidad a antibióticos (Figura 11A), mediante el método de difusión en disco en cajas de Petri con agar Mueller-Hinton (MH) (Anexo no. 5) (Bioxon). Se emplearon sensidiscos para bacterias Gram negativas (Bio-Rad Gram Negativos II). Se evaluaron 12 antibióticos: amikacina, 30 µg; ampicilina, 10 µg; levofloxacina, 5 µg; cefalotina, 30 µg; cefotaxima, 30 µg; ceftriaxona, 30 µg; cloranfenicol 30 µg; gentamicina, 10 µg; Netilmicina 30 µg; Nitrofurantoína 300 µg; Cefepime 30 µg; Trimetoprim-Sulfametoxazol 25 µg. Adicionalmente, se utilizaron sensidiscos para bacterias Gram positivas (Bio-Rad). Se evaluaron 12 antibióticos: ampicilina, 10 µg; cefalotina, 30 µg; cefotaxima, 30 µg; ceftazidima, 30 µg; cefuroxima, 30 µg; dicloxacilina, 1 µg; eritromicina, 15 µg; gentamicina, 10 µg; pefloxacina, 5 µg; penicilina, 10 U; tetraciclina, 30 µg y Trimetoprim-Sulfametoxazol 25 µg. Los aislados se clasificaron como resistentes, intermedios, o sensibles, dependiendo del diámetro del halo de inhibición (incluyendo los 6 mm del disco) de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. En la figura 11B se observa la medición en mm del halo de inhibición.



Figura 11. Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana de los aislados bacterianos asociados a QIB. Sensidiscos con 12 antimicrobianos (A) y medición del halo de inhibición con regla en mm (B).

4.8 Extracción de ADN

Los aislados fueron cultivados toda la noche en caldo LB. Posteriormente se obtuvo la pastilla celular mediante centrifugación a 12,000 rpm por 5 min. Posteriormente, se resuspendió en 450 μ l de solución TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM, pH 7.5), se le adicionó 20 μ l de lisozima (20 mg/ ml) y se incubó por 15 min a 37 °C. Se le adicionó 50 μ l de solución SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% y se incubó a 37 °C por 15 min. Se agregaron 100 μ l de solución NaCl 5 M y se incubó a 65 °C por 5 min, se añadieron 80 μ l de la solución CTAB 10% (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)/NaCl 0.7 M y se incubó por 10 min a 65 °C. Enseguida se adicionaron 500 μ l de fenol: cloroformo:alcohol isoamílico en relación 24:24:1, una vez mezclado se adicionaron 5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) continuando con la centrifugación a 10,000 rpm por 5 min. Finalmente se colectó la fase acuosa en tubos nuevos. El ADN se precipitó con un volumen de etanol absoluto (aprox. 1000 μ l) e

incubó por 20 min a -80 °C. El ADN se colectó por centrifugación a 12,000 rpm, a 4 °C por 15 min. La pastilla resultante se lavó con 200 µl de etanol al 70%, nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm, a 4 °C por 3 min, procedimiento que se realizó dos ocasiones. Se retiró el etanol y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por unos minutos. Posteriormente, el ADN se resuspendió en 45 µl de agua desionizada, se colocó 15 min a 37 °C y se revisó su integridad a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 12).

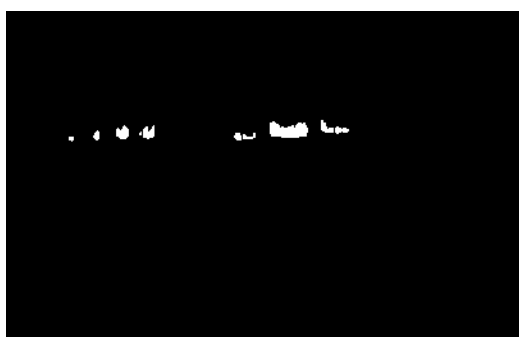


Figura 12. Obtención del ADN de los aislados bacterianos asociados a QIB. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.9 Identificación de los aislamientos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (ARNr 16S)

La identificación de los aislados correspondientes se llevó a cabo por análisis molecular amplificando una región del gen ribosomal 16S, cuyo tamaño del producto fue aproximadamente 1.5 kb. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Directo 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG- 3' (Elim biopharmaceuticals), y Reverso 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT- 3' (Elim biopharmaceuticals). Como control negativo se empleó agua para PCR en lugar de ADN en las reacciones.

La amplificación por PCR se llevó a cabo con 50 ng de ADN genómico (molde), el cual se mezcló con 2 µl de Buffer 10X (Tris-Cl 100 mM, KCl 500 mM); MgCl₂ 1.5 mM; 2 µl de dNTP's 2 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 1 µl de *Taq* ADN polimerasa (1 U/ µl) y se adicionó agua destilada estéril hasta un volumen final de 20 µl. La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: para el paso inicial se usó una temperatura de 95 °C por 5 min; posteriormente se realizaron 30 ciclos con el siguiente programa: 30 seg a 95 °C para la desnaturalización del ADN, posteriormente 30 seg a 58 °C para el alineamiento de los oligonucleótidos, la extensión se llevó a cabo a 72 °C durante 1.5 min. Al final se le dio una extensión de 5 min a 72 °C. Se revisó y analizó la integridad de los productos de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 13).

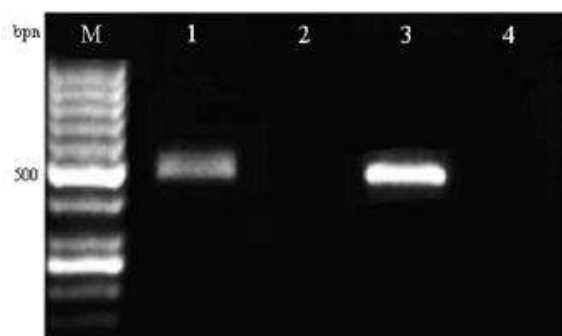


Figura 13. Amplificación de una región del ARNr 16S de los aislados bacterianos asociados a QIB. Electroforesis de los productos amplificados por PCR. Se muestra el marcador de tamaño molecular (M) y los productos de amplificación de dos aislados bacterianos (carriles 1 y 3).

4.10 Secuenciación de los productos del gen ARNr 16S amplificados por PCR

Los productos de la amplificación se remitieron para su secuenciación a Elim Biopharmaceuticals, Inc., atendiendo las especificaciones para su envío e incluyeron los oligos, el directo UBF (León-Galván, 2015) y el reverso 1492 (León-Galván, 2015) con una Tm 58 °C.

4.11 Comparación de la secuencia parcial del ARNr 16S de los aislados con las disponibles en la base de datos del GenBank

Los electroferogramas derivados de la secuenciación se interpretaron mediante el programa Mega 7.0.7 (DNASTAR). Las secuencias obtenidas del gen ARNr 16S se compararon con las disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para evaluar la identidad de los aislados a través de la opción BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/>).

4.12 Análisis estadístico

Los datos de animales que mostraron signología sugerente a QIB, fueron analizados mediante estadística descriptiva para calcular el porcentaje de animales con lesiones en función de la edad (adultos y jóvenes), sistema de producción (extensivo, semiextensivo e intensivo) y de la raza (Holstein, Simmental y cruce Holstein-Simmental). Adicionalmente, se calculó el porcentaje de animales en los cuales se encontró el género *Moraxella* como agente causal en función de la población animal incluida en el estudio.

V. RESULTADOS

5.1 Número de animales y de hatos muestreados por localidad

En este estudio se identificaron 17 bovinos (2.23%) con lesión ocular, presuntivamente QIB, de una población de 761 ubicados en 5 localidades y distribuidos en 11 hatos. La proporción de animales con QIB osciló del 1% al 7% en los diferentes hatos. El número de animales afectados y el número de hatos muestreados por localidad, fueron 7 en Sahuayo (5 hatos), 4 en Marcos Castellanos (3 hatos), 2 en Uruétaro (1 hato), en Emiliano Zapata 2 (1 hato) y en Villa Madero 2 animales (1 hato) (Tabla 2).

5.2 Sistemas de producción en los 11 hatos muestreados

Los sistemas de producción identificados en los hatos muestreados fueron los siguientes: 1 y 2 intensivo (18.18%), el hato 3 extensivo (9.09%) y los hatos 4 al 11 semiextensivo (72.72%) (Tabla 2).

Tabla 2. Sistemas de producción, número de animales y hatos muestreados por localidad.

Localidad	Número de hato	Hatos muestreados	Tamaño del hato	Animales con lesiones oculares	%	Sistema de producción
Uruétaro	1	1	29	2	6.89	Intensivo
Emiliano Zapata	2	1	58	2	3.44	Intensivo
Villa Madero	3	1	33	2	6.06	Extensivo
Sahuayo	4	5	68	1	1.47	Semiextensivo
Sahuayo	5		53	1	1.88	Semiextensivo
Sahuayo	6		42	1	2.38	Semiextensivo
Sahuayo	7		100	2	2.0	Semiextensivo
Sahuayo	8		130	2	1.53	Semiextensivo
Marcos Castellanos	9	3	78	2	2.56	Semiextensivo

Marcos Castellanos	10		100	1	1.0	Semiextensivo
Marcos Castellanos	11		70	1	1.42	Semiextensivo
		11	761	17	2.23	

5.3 Categorización de los bovinos con lesiones oculares

La raza predominante del total de animales con signología (n=17) fue Holstein, con 88% (15 bovinos), un 6% cruza de Holstein-Simmental (un bovino) y un 6% de raza Simmental (un bovino). Respecto a la edad únicamente un macho de 6 meses fue incluido en el estudio y los 16 casos restantes tenían edades de 1.5 a 12 años, además eran hembras en producción láctea (Tabla 3).

5.4 Obtención de muestras oculares

De los 17 animales muestreados, 15 presentaron lesión en un solo ojo y 2 animales en ambos ojos, de esta manera, fueron cultivadas 34 muestras, de las cuales 15 fueron de ojos sanos y 19 de ojos lesionados. De estas se obtuvieron 25 colonias de ojos lesionados y 13 colonias de ojos sanos. En total se obtuvieron 38 aislados, los cuales fueron denominados de manera ascendente de la M1 hasta la M38 (Tabla 3), todos poseían características morfológicas asociadas al género *Moraxella* (Tabla 4).

Tabla 3. Número de muestras obtenidas del cultivo de aislados oculares en agar sangre.

Caso Clínico	Localidad	Raza	Edad Años	Hato	Ojo lesionado	Ojo muestreado	Colonias aisladas	Registro de la muestra
1	Uruétaro	Holstein	4	1	Der. e izq.	Izquierdo	1	M1
					Der. e izq.	Izquierdo	1	M2
					Der. e Izq	Derecho	1	M3
					Der. e Izq	Derecho	2	M4
2	Uruétaro	Holstein	4	1	Derecho	Izquierdo	1	M5
					Derecho	Izquierdo	2	M6
3	Emiliano Zapata	Holstein	4	2	Izquierdo	Derecho	1	M7
					Izquierdo	Izquierdo	1	M8
4	Emiliano Zapata	Hostein	5	2	Izquierdo	Derecho	1	M9
					Izquierdo	Derecho	2	M10
5	Villa Madero	Simental-Holstein	3	3	Der. e Izq.	Derecho	1	M11
					Der. e Izq.	Derecho	2	M12
					Der. e Izq.	Izquierdo	1	M13
					Der. e Izq.	Izquierdo	2	M14
					Der. e Izq.	Izquierdo	3	M15
6	Villa Madero	Simental	6 m		Derecho	Derecho	1	M16
					Derecho	Derecho	2	M17
					Derecho	Derecho	3	M18
7	Sahuayo	Holstein	2	4	Derecho	Derecho	1	M19
					Derecho	Izquierdo	1	M20
8	Sahuayo	Holstein	1.5	4	Derecho	Izquierdo	1	M21
					Derecho	Derecho	1	M22
9	Sahuayo	Holstein	3	5	Izquierdo	Izquierdo	1	M23
10	Sahuayo	Holstein	4.6	6	Derecho	Izquierdo	1	M24
					Derecho	Derecho	1	M25
11	Sahuayo	Holstein	9	7	Izquierdo	Izquierdo	1	M26
					Izquierdo	Derecho	1	M27
12	Sahuayo	Holstein	3.5 años	8	Derecho	Izquierdo	1	M28
					Derecho	Derecho	1	M29
13	Sahuayo	Holstein	4.5 años	8	Izquierdo	Derecho	1	M30
					Izquierdo	Izquierdo	1	M31
14	Marcos Castellanos	Holstein	6 años	9	Derecho	Derecho	1	M32
					Derecho	Derecho	2	M33
					Derecho	Izquierdo	1	M34
15	Marcos Castellanos	Holstein	8 años	9	Derecho	Derecho	1	M35
16	Marcos Castellanos	Holstein	12 años	10	Derecho	Derecho	1	M36
					Derecho	Derecho	2	M37
17	Marcos Castellanos	Holstein	7 años	11	Derecho	Izquierdo	1	M38

5.5 Identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas de las diferentes colonias

Los resultados obtenidos mediante tinción Gram de las 38 muestras (Tabla 4) fueron 28 Gram positivas y 10 Gram negativas, que corresponde al 74 y 26%, respectivamente.

Tabla 4. Colonias seleccionadas de acuerdo a sus características morfológicas después de 24 h de cultivo a 37 °C y resultados de la tinción Gram.

No. de muestra	Morfología	Tinción Gram
M1	Blancas, 1-3 mm, redondas, convexas, cremosas	+
M2	Blancas, 1-3 mm, redondas, convexas	+
M3	Blanca. 1 mm, redonda, convexa, halo grisáceo	+
M4	Blanca, 1-3 mm, redonda, convexa	+
M5	Blancas 1-3 mm, redondas, convexas, borde definido	+
M6	Blancas 1-3 mm, redondas, convexas, borde definido	-
M7	Amarilla, 2 mm, redonda, convexa, hemolisis	+
M8	Blancas, 2-3 mm, redonda, ligeramente convexa	+
M9	Amarilla, 2 mm, redonda, convexa, hemolisis	+
M10	Blanca, 3 mm, redonda irregular, lisa	+
M11	Blanca, 3 mm, redonda, poco convexa, borde liso	+
M12	Blanca, 4 mm, redonda, borde liso, poco convexa	+
M13	Blanquecina, 2 mm, circular irregular, poco convexa, borde liso	-
M14	Blanco-amarillenta, 1 mm, circular, convexa, bordes lisos	-
M15	Blanca, 2 mm, circular, convexa, borde liso, hemolisis extensa	+
M16	Blanquecinas-grises, 2 mm, circular, convexa	-
M17	Gris-blanquecinas, 2 mm, circulares, convexas	+
M18	Gris-blanquecinas, 2 mm, circulares, convexas	+
M19	Amarilla, 3 mm, irregularmente redonda, convexa	+
M20	Gris transparente, 1 mm, redondas, convexas	+
M21	Blanquecina transparente, 2 mm, circular, convexa	-
M22	Blanquecina, 2 mm, circular, poco convexa	+
M23	Gris transparente, 1 mm, redondas, convexas	+
M24	Blanquecina, 2 mm, circular	+
M25	Blanquecina, 1 mm, poco convexa	+
M26	Blanquecina, 2 mm, circular	+
M27	Gris-blanquecina-transparente, 1 mm, circular	-
M28	Gris-blanquecina-transparente, 1 mm, redonda	-
M29	Gris- blanquecina, 1 mm, redonda	-
M30	Gris-blanquecina-transparente, 1 mm, circular	+
M31	Gris-blanquecina, 1 mm, circular	+
M32	Blanca-gris. 3 mm, circular, convexa	-
M33	Blanca-gris. 3 mm, circular, convexa	+
M34	Grisácea, 1 mm, circulares, convexa, hemolítica	+
M35	Amarilla, 2 mm, circular, convexa	+
M36	Amarilla, 2 mm, circular, convexa, hemolítica	+
M37	Brillantes, 1 mm, hemolíticas	+
M38	Colonia pequeña, circular	-

5.6 Microorganismos identificados de los aislados oculares de bovinos con lesiones características de QIB

En el presente estudio la identidad molecular de los aislados de las lesiones oculares asociadas a QIB fue un 74% de bacterias Gram positivas (Tabla 4). Se identificaron las especies bacterianas: *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus agnetis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus mundtii*, *Bacillus aerius*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus pumilus*, *Rhotia nasimurium*, *Arthobacter gandavensis*, *Arthobacter luteolus*, *Peptoniphilus indolicus*, y *Corynebacterium Aquilae*.

El 26% restante correspondió a bacterias Gram negativas (Tabla 4). Se identificaron las especies bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas zhaodongensis*, *Mannheimia granulomatis*, *Acinetobacter schindler*, *Enterobacter mori*, *Moraxella equi* y *Moraxella bovoculi* (Tabla 5).

Los géneros más frecuentes obtenidos en este estudio fueron *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthobacter*. El género que predominó fue *Staphylococcus* y las bacterias aisladas con mayor frecuencia fueron, 6 *S. saprophyticus* (15%), 4 *M. bovoculi* (10.25%), 4 *S. agnetis* (10.25%), 3 *S. uberis* (7.59%), 2 *S. chromogenes* (5.12%) y 2 *A. luteolus* (5.12%); correspondiendo a las 17 restantes especies un solo aislado (2.56%) (Tabla 6).

Tabla 5. Microorganismos identificados mediante la secuenciación del ARNr 16S de los 38 aislados asociados a QIB.

No. de muestra	Caso clínico	Hato	Localidad	Microorganismo identificado
M1	1	1	Uruétaro	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
M2			Uruétaro	<i>Rhotia nasimurium</i>
M3	2	1	Uruétaro	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
M4			Uruétaro	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
M5			Uruétaro	<i>Bacillus toyonensis</i>
M6			Uruétaro	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
M7	3	2	Emiliano Zapata	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
M8			Emiliano Zapata	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
M9	4	2	Emiliano Zapata	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
M10			Emiliano Zapata	<i>Enterococcus mundtii</i>
M11	5	3	Villa Madero	<i>Staphylococcus agnetis</i>
M12			Villa Madero	<i>Staphylococcus agnetis</i>
M13			Villa Madero	<i>Moraxella bovoculi</i>
M14			Villa Madero	<i>Moraxella bovoculi</i>
M15			Villa Madero	<i>Streptococcus uberis</i>
M16	6	3	Villa Madero	<i>Mannheimia granulomatis</i>
M17			Villa Madero	<i>Streptococcus uberis</i>
M18			Villa Madero	<i>Streptococcus uberis</i>
M19	7	4	Sahuayo	<i>Arthobacter luteolus</i>
M20			Sahuayo	<i>Bacillus aerius</i>
M21	8	4	Sahuayo	<i>Moraxella equi</i>
M22			Sahuayo	<i>Arthobacter gandavensis</i>
M23	9	5	Sahuayo	<i>Arthrobacter lutealus</i>
M24	10	6	Sahuayo	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
M25			Sahuayo	<i>Peptoniphilus indolicus</i>
M26	11	7	Sahuayo	<i>Bacillus pumilus</i>
M27			Sahuayo	<i>Moraxella bovoculi</i>
M28	12	8	Sahuayo	<i>Pseudomonas zhaodongensis</i>
M29			Sahuayo	<i>Moraxella bovoculi</i>
M30	13	8	Sahuayo	<i>Staphylococcus agnetis</i>
M31			Sahuayo	<i>Corynebacterium aquilae</i>
M32	14	9	Marcos Castellanos	<i>Enterobacter mori</i>
M33			Marcos Castellanos	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
M34			Marcos Castellanos	<i>Streptococcus suis</i>
M35	15	9	Marcos Castellanos	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
M36	16	10	Marcos Castellanos	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
M37			Marcos Castellanos	<i>Staphylococcus agnetis</i>
M38	17	11	Marcos Castellanos	<i>Acinetobacter Schindler</i>

Tabla 6. Frecuencia de aislamiento de la microbiota asociada a QIB.

Microorganismo aislado	Porcentaje
<i>Acinetobacter Schindler</i>	2.56
<i>Rhotia nasimurium</i>	2.56
<i>Bacillus toyonensis</i>	2.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.56
<i>Enterococcus mundtii</i>	2.56
<i>Mannheimia granulomatis</i>	2.56
<i>Bacillus aerius</i>	2.56
<i>Moraxella equi</i>	2.56
<i>Arthobacter gandavensis</i>	2.56
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.56
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	2.56
<i>Bacillus pumilus</i>	2.56
<i>Pseudomonas zhaodongensis</i>	2.56
<i>Corynebacterium aquilae</i>	2.56
<i>Enterobacter mori</i>	2.56
<i>Streptococcus suis</i>	2.56
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2.56
<i>Arthobacter luteolus</i>	5.12
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	5.12
<i>Streptococcus uberis</i>	7.59
<i>Staphylococcus agnetis</i>	10.25
<i>Moraxella bovoculii</i>	10.25
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	15.0

De los 38 aislados, 6 fueron de Tarímbaro tomados de dos animales en un solo hato, cuyo sistema de producción fue intensivo. De ellos, el 50% de los aislados fue *S. saprophyticus*, también se identificó a *R. nasimurium*, *B. toyonensis* y *P. aeruginosa*. Todas las bacterias se aislaron de ojos lesionados y únicamente *S. saprophyticus* de ojos sanos.

En Emiliano Zapata se obtuvieron 4 aislados de un hato y de 2 animales, 3 de ellos fueron *S. saprophyticus* y 1 *E. mundtii*, en un sistema de producción intensivo. Únicamente *S. saprophyticus* se obtuvo del ojo lesionado.

En Marcos Castellanos se obtuvo una diversidad bacteriana amplia, de los 7 aislados obtenidos de 4 hatos y 4 animales mantenidos en un sistema semiextensivo, se aislaron *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. agnetis*, *E. mori*, y en ojos sanos *S. suis* y *A. schindler*. El género *Staphylococcus* fue el de mayor presencia.

En Villa Madero se identificaron 8 aislados, todos provenientes de un hato y 2 animales los cuales se mantenían en un sistema semiextensivo. Aquí se identificaron aislados de las especies *S. agnetis*, *S. uberis*, *M. granulomatis* y *M. bovoculi* en ojos lesionados. En esta localidad predominó *S. uberis*.

En Sahuayo, de 13 aislados se identificaron 11 diferentes microorganismos en 5 hatos y 7 animales, todos provenientes de un sistema semiextensivo. En ojos sanos se obtuvieron *B. aerius*, *M. equi*, *S. dysgalactiae*, *M. bovoculi*, *P. zhaodongensis* y *S. agnetis*. Mientras que en ojos lesionados se identificó a *A. luteolus*, *A. gandavensis*, *P. indolicus*, *B. pumilus*, *M. bovoculi* y *C. aquilae*, en esta localidad se observó la más amplia diversidad (Tablas 2, 3 y 5).

Cabe destacar que tres de los aislados obtenidos de tres casos de QIB presentaron 100% de homología con la secuencia de la cepa 237 de *M. bovoculi* depositada en la base de datos NCBI. El primero fue el caso número 5, de raza cruce Simental-Holstein de Villa Madero, de ahí se obtuvieron los aislados M13 y M14 del mismo ojo lesionado; el segundo correspondió al caso número 11, raza Holstein del hato 8 en Sahuayo, se obtuvo el aislado M27 de un ojo sano; el tercero se obtuvo del mismo hato y fue el caso número 12, raza Holstein, aislado M29 de un ojo lesionado (Tablas 3 y 5).

5.7 Sensibilidad antimicrobiana

En este estudio se analizó la sensibilidad antimicrobiana de los aislados, los patrones de resistencia se muestran en la tabla 7. Se observó multiresistencia a diferentes grupos de antibióticos. Los aislados de *S. saprophyticus* mostraron resistencia en un 100% a ceftazidima, dicloxacilina y penicilina (casos 1,2,3,4), el 33.3% (2/6) a la tetraciclina (casos 3,4) en Emiliano Zapata y un 16.6% (1/6) se observó con eritromicina (caso 2) en Uruétaro, similar porcentaje (1/6) a la ampicilina (caso 3) en Emiliano Zapata.

El 100% (3/3) de los aislados de *S. agnetis* fueron resistentes a dicloxacilina (casos 5,13,16), el 66,6% (2/3) a ceftazidima (casos 5, 13) en Villa Madero y Sahuayo y el 33.3% (1/3) a penicilina y ampicilina (caso 5) de Villa Madero (Tabla 7).

Los aislados de *S. chromogenes* presentaron 50% (1/2) de resistencia a ceftazidima y a dicloxacilina (caso 15) (Tabla 7), mientras que, el caso 14 fue sensible a todos los antimicrobianos, ambos casos encontrados en la comunidad de Marcos Castellanos y del hato 9 (Tabla 5). Igualmente, *S. haemolyticus* (caso 16) (Tabla 5) fue sensible a todos los antimicrobianos.

Los aislados del género *Streptococcus* en sus especies *dysgalactiae*, *suis* y *uberis* fueron resistentes 100% (2/2) a dicloxacilina (casos 5,6) y un 50% (1/2) a penicilina, ampicilina y ceftazidima (caso 5), ambos casos pertenecieron a Villa Madero y al hato 3 (Tabla 7). *S. dysgalactiae* y *S.suis* casos 10 y 14 respectivamente (Tabla 5) fueron sensibles a todos los antimicrobianos.

Los aislados de *A. luteolus* (casos 7,9) y *A. gandavensis* (caso 8) mostraron resistencia en un 100% (3/3) a penicilina, el 100% de *A. luteolus* a pefloxacina (casos

7,9) y el 50% (1/2) a doxiciclina (caso 9). *A. gandavensis* (caso 8) también fue resistente a cefalotina, ceftazidima, eritromicina, ampicilina y a doxiciclina.

Respecto a los aislados identificados como *B. toyonensis* (caso 2), *B. aerius* (caso 7) y *B. pumilus* (caso 11), estos fueron resistentes a doxiciclina, *B. toyonensis* y *B. aerius* a ceftazidima (casos 2 y 7) y *B. toyonensis*, *B. aerius* y *B. pumilus* a penicilina (caso 2), cefotaxima (caso 7) y a cefuroxima (caso 11), respectivamente.

Hubo muestras de las que solo se obtuvo un aislado de *R. nasimurium* que presentó resistencia a ceftazidima, dicloxacilina y penicilina (caso 1). *P. indolicus* a dicloxacilina y penicilina (caso 10) y *C. aquilae* (caso 13) a cefalotina, ceftazidima, eritromicina, ampicilina, pefloxacina, dicloxacilina y penicilina. *Enterococcus mundtii* (caso 10) (Tabla 5) mostró sensibilidad a todos los antimicrobianos.

El mayor porcentaje de resistencia de los 24 aislados Gram + fue hacia el antibiótico doxiciclina (75%, 18/24), a ceftazidima y penicilina en un 54.1% (13/24).

Los aislados con multiresistencia (a partir de 5 antimicrobianos) fueron *S. saprophyticus* (caso 3) de Emiliano Zapata, *A. gandavensis* (caso 8) de Sahuayo y *C. aquilae* (caso 13) de Sahuayo, los 3 de diferente hato (Tabla 7).

Tabla 7. Sensibilidad antimicrobiana de los aislados asociados a QIB.

Aislado	Caso clínico	Localidad	Patrón de resistencia antimicrobiana
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	Uruétaro	CAZ, DC, PE
	2	Uruétaro	CAZ, E, DC, PE
	2	Uruétaro	CAZ,E, DC, PE
	3	Emiliano Zapata	CAZ, AM, DC, PE
	3	Emiliano Zapata	CAZ, TE, DC, PE
	4	Emiliano Zapata	CAZ, TE, DC, PE
<i>Staphylococcus agnetis</i>	5	Villa Madero	CAZ, AM, DC, PE

	5	Villa Madero	CAZ
	13	Sahuayo	CAZ, DC
	16	Marcos Castellanos	DC
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	15	Marcos Castellanos	CAZ, DC
<i>Streptococcus uberis</i>	5	Villa Madero	CAZ, AM,DC,PE
	6	Villa Madero	DC
	6	Villa Madero	DC
<i>Arthobacter luteolus</i>	7	Sahuayo	PEF, PE
	9	Sahuayo	PEF, DC, PE
<i>Arthobacter gandavensis</i>	8	Sahuayo	CF, CAZ, E, AM, DC, PE
<i>Rhotia nasimurium</i>	1	Uruétaro	CAZ, DC, PE
<i>Bacillus toyonensis</i>	2	Uruétaro	CAZ, DC, PE
<i>Bacillus aerius</i>	7	Sahuayo	CAZ, CTX, DC
<i>Bacillus pumilus</i>	11	Sahuayo	CMX, DC
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	10	Sahuayo	DC, PE
<i>Corynebacterium aquilae</i>	13	Sahuayo	CF, CAZ, E, AM, PEF, DC, PE
<i>Pseudomona Aeruginosa</i>	2	Uruétaro	NF, CL, CRO, AM, STX, CTX, CF,FEP
<i>Pseudomonas zhaodongensis</i>	12	Sahuayo	AM, LEV
<i>Enterobactter mori</i>	14	Marcos Castellanos	AM, CF
<i>Acinetobacter Schindler</i>	17	Marcos Castellanos	AM, CF
<i>Moraxella equi</i>	8	Sahuayo	AM, CF
<i>Moraxella bovoculli</i>	5	Villa Madero	AM, CF
	5	Villa Madero	AM, CF
	11	Sahuayo	AM, CF

CF Cefalotina 30 µg, CAZ Ceftazidima 30 µg, E Eritromicina 15 µg, Ampicilina 10 µg, TE Tetraciclina 30 µg, STX Trimetoprim sulfametoxazol 25 µg, CTX Cefotaxima 30 µg, GE Gentamicina 10 µg, CXM Cefuroxima 30 µg, PEF Pefloxacina 5 µg, DC Dicloxacilina 1 µg, PE Penicilina 10U.

NF Nitrofurantoína 300 µg, CL Cloranfenicol 30 µg, CRO Ceftriaxona 30 µg, AM Ampicilina 10 µg, AK Amikacina 30 µg, STX Trimetoprim sulfametoxazol 25 µg, CTX Cefotaxima 30 µg, GE Gentamicina 10 µg, CF Cefalotina 30 µg, FEP Cefepime 30 µg, NET Netilmicina 30 µg, LEV Levofloxacina 5 µg.

Las aislados Gram negativos fueron 7, de los cuales solo *M. granulomatis* mostró sensibilidad a todos los antimicrobianos, el resto de los aislados (Tabla 7)

presentaron resistencia a antimicrobianos con diferentes patrones, de ellos *P. aeruginosa* (caso 2) fue multiresistente en un 66.6% (8/12), estos fueron nitrofurantoína, cloranfenicol, ceftriaxona, ampicilina, trimiteprim sulfametoxazol, cefotaxima, cefalotina y cefepime, y de la misma familia *P. zhaodongensis* (caso 6) solo incluyó a ampicilina y levofloxacin.

P. aeruginosa fue obtenido de un ojo lesionado del caso 2, hato 1, de este mismo caso se obtuvieron *S. saprophyticus*, *B. toyonensis*, ambos resistentes a ceftazidima, dicloxacilina y penicilina. *S. saprophyticus* también fue resistente a eritromicina. *E. mori* (caso 14), *A. schindler* (caso 17) y *M. equi* (caso 8) presentaron resistencia a ampicilina y cefalotina.

Se obtuvo *M. bovoculi* en tres casos clínicos, de tres hatos diferentes. El caso 5, del hato 3 de Villa Madero, el caso 11 del hato 7 y el caso 12 del hato 8 ambos de Sahuayo (tabla 5). Los casos 5 y 11 (66.6%) fueron resistentes a ampicilina y cefalotina y el caso 12 fue sensible a todos los antimicrobianos.

El mayor porcentaje de resistencia de los aislados Gram negativos fue a ampicilina en un 100%, a cefalotina el 85.7% (6/7) y a levofloxacin (1/7) el 14.2% (Tabla 7).

VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio el sistema de producción a partir del cual se obtuvieron el mayor número de muestras fue el semiextensivo. Este es un sistema semiestabulado donde los animales permanecen durante algunas horas confinados en establos, normalmente por la tarde y noche, siendo expuestos a los factores ambientales en espacios abiertos al pastorear por la mañana y tarde cuando la radiación solar es más intensa, momento en el que tienen la posibilidad de contacto con factores mecánicos como pastos altos, semillas, polen y el polvo, material que puede lacerar la córnea y de esta manera adquirir las condiciones óptimas para la invasión del agente infeccioso. Interesantemente, dos casos en donde fue aislada la especie *M. bovoculi* provienen de animales bajo este sistema de producción y un tercero de sistema extensivo, en el cual los animales siempre están bajo condiciones de pastoreo. Si bien, Odeón *et al* (2006) y Gasque (2008) refieren que en cualquier sistema de producción se presenta la QIB, su presencia se ve favorecida en el sistema extensivo, siendo más alta la incidencia en primavera y verano cuando la cantidad de moscas se incrementa; sin embargo, también se presenta en invierno cuando el ganado se encuentra confinado en establos cerrados. En este caso el periodo de muestreo involucró 2.5 meses de verano, la estación de otoño y 15 días de invierno, observándose 17 casos clínicos que corresponde al 2.23% de incidencia.

Está bien documentado que la incidencia de la QIB es mayor en los animales cuyos párpados son despigmentados, por ello esta enfermedad es más frecuente en el ganado europeo que el cebuino, por lo que es común observar esta enfermedad en las razas Hereford, Charolais, Holstein, Chianina, Simental y Criollo (Baptista,

1979; Caspari *et al.*, 1980; Gasque, 2008). Si bien en este estudio se incluyeron razas productoras de leche, la raza predominante fue la Holstein por sus características zootécnicas para la producción. Esta es una de las razas con mayor predisposición, al igual que todas aquellas con párpados despigmentados. En este estudio, de los 17 casos detectados con lesiones oculares, 15 fueron Holstein, una Holstein-Simental oscilando la edad de 1.5 a 12 años, y uno Simental de 6 meses (ver Tabla 3). No obstante que los animales de menos de un año (Gasque, 2008) presentan mayor predisposición, la QIB se puede adquirir a cualquier edad, lo cual se observó en este estudio; 16 de los casos se detectaron en animales adultos productores de leche, con un solo caso de un becerro raza Simental de 6 meses.

La flora bacteriana normal de la conjuntiva en las diferentes especies animales se ha estudiado poco, de tal forma que no existen parámetros fenotípicos y genotípicos que permitan comparar la flora bacteriana del ojo de bovinos clínicamente sanos y aquellos animales con QIB. Wilcox (1970) comparó la flora bacteriana del saco conjuntival de bovinos clínicamente sanos y bovinos afectados con QIB, evaluando las características de las colonias, la tinción Gram, morfología y pruebas bioquímicas, asignando género y en la medida de lo posible la especie. En ambos grupos se aisló a *M. bovis*, *M. liquefaciens*, *M. nonliquefaciens*, *Acinetobacter* sp, *N. catarrhalis*, *Actinobacillus* sp., bacilos Gram negativos no identificados, Corynebacterias, *Bacilos* sp, *S. faecalis* y cocos Gram positivos no identificados. En las vacas con QIB también se aisló a *Proteus* sp, mientras que en animales sanos se encontró *Moraxella* no clasificada, además de coliformes y *S. aureus*. En similares circunstancias para la identificación de microorganismos presentes en bovinos con

QIB, Spradbrow (1967) aisló en alto porcentaje varias especies de *Neisseria* y en menor proporción *Achromobacter*, *Haemophilus*, *Micrococcus*, *Corynebacterias* y *M. bovis*, esta última únicamente en dos hatos de 25 que incluyó el estudio. En el mismo sentido, Barbar *et al* (1986) identificaron a *M. bovis*, *M. catarrhalis* y a *Mycoplasma bovoculi* como parte de la flora bacteriana normal en terneros sanos. Por su parte, Sarma *et al* (1989) aislaron *Streptococcus ssp.*, *M. haemolytica*, *Corynebacterium bovis*, *Micrococcus spp.*, ambos autores citados por Sosa (2013). En un estudio realizado por Hare *et al* (2008) se aislaron *Exiguobacterium acetylicum*, *Arthrobacter gandavensis*, *A. luteolus*, *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* y *Acinetobacter spp* de casos clínicos de QIB. En un estudio similar realizado por Sosa (2013) en Uruguay, en el que se analizó fenotípica y genotípicamente los componentes de la biota bacteriana asociada a brotes de QIB, se identificó a *S. pasteurii*, *S. pluranimalium*, *Granulicatella spp.*, *P. multocida*, *Trueperella pyogenes*, *Acinetobacter spp.*, *Pantoea spp.* y *Pseudomonas*, además de *Aeromicrobium*, *Microbacterium*, *Acetobacter* y *Arthrobacter*. También se aislaron a *Desemzia incerta* y *Cellulomonas spp.* pertenecientes a la biota ambiental. Como puede deducirse de estos estudios, la flora asociada al ojo en animales sanos e infectados es diversa, y no existe una flora típica. En congruencia con estos estudios, en el presente trabajo la identidad de los aislados de las lesiones oculares asociadas a QIB fue diversa, predominaron las Gram positivas en un 74%, similar al 70% informado por Sosa (2013), estudios en humanos con conjuntivitis reflejan porcentajes similares (Hernández y Quintero, 2003). Dentro del grupo de las Gram positivas se identificaron diversas especies, predominando el género *Staphylococcus* (Tabla 5).

Por otro lado, el 26% restante correspondió a bacterias Gram negativas, predominado el género *Moraxella*, con dos especies: *M. equi* y *M. bovoculi*.

Algunas de las bacterias que se aislaron en este estudio se han asociado como agentes etiológicos de conjuntivitis y queratitis en bovinos, otros son microorganismos presentes en la conjuntiva de animales sanos, o habitan la piel y fosas nasales y ascienden al ojo provocando infección debido a que son oportunistas (Handool, 2013) considerando que normalmente no se asocian con enfermedad ocular bovina (Galvão y Angelos, 2010), o bien, su diseminación se ve favorecida por las condiciones ambientales de una granja.

Por otro lado, algunos microorganismos que fueron identificados se consideran como agentes ajenos o raros en estas condiciones ambientales. La identificación de estas bacterias patógenas oportunistas se atribuye a su proliferación por medio de los factores meteorológicos, como las corrientes de aire en la atmosfera, considerada como un medio de distribución y supervivencia de microorganismos, debido a que la humedad relativa aporta agua, carbono, así también, el material particulado proporciona fuentes de nutrientes como sustrato e igualmente un medio de transporte, bajo estas condiciones las bacterias se pueden encontrar en las partículas de aerosol, las cuales provienen del suelo, agua y de la superficie de las plantas (Nanclares, 2016).

Respecto a la mayor proporción de bacterias Gram positivas, y de acuerdo con Atlas y Bartha (1997) y Rosa *et al* (2002) citados por Nanclares (2016), en un estudio donde se identificó la microbiota ambiental, refieren un 88% de esta

población a bacterias de este grupo, atribuyendo su mayor abundancia a la resistencia ante condiciones secas y adversas por poseer una pared celular más gruesa y rica en péptidoglicano (Nanclares, 2016).

Parte de la microflora bacteriana asociada a casos de QIB en este estudio, fue parecida a la obtenida por otros autores considerando que no existe información suficiente que permita comparar los resultados obtenidos, además de que en cada región geográfica se caracteriza por ser diferente.

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos mostraron que los aislados asociados a QIB poseen amplia resistencia a β -lactámicos, principalmente penicilina, ampicilina y doxiciclina. Muchos géneros de bacterias Gram negativas poseen una β -lactamasa mediada por cromosomas de origen natural que les confiere resistencia a este grupo de antibióticos, esta enzima también se ha asociado a la aparición de resistencia en *S. aureus* y a otras especies de este género (Bradford, 2001). Otro factor que ha contribuido a la resistencia bacteriana se atribuye al uso común de estos fármacos en el tratamiento de diferentes enfermedades de tipo infeccioso en bovinos, situación que condiciona la selección de microorganismos resistentes a estos antimicrobianos (Ochoa *et al.*, 2008). Bradford (2001) señala que el diseño de nuevos antibióticos β -lactámicos resistentes a la acción hidrolítica de las β -lactamasas ha provocado también que surgieran nuevas β -lactamasas que favorecen la selección de resistencia a esa clase de fármacos. Presumiblemente, la presión selectiva derivada del uso y el abuso de nuevos antibióticos en el tratamiento de pacientes ha seleccionado nuevas variantes de β -lactamasa.

Otro punto a considerar es el espectro de acción reducido de algunos antibióticos sobre bacterias Gram negativas, como es el caso de las cefalosporinas de primera generación. Además, las cefalosporinas de tercera generación no tienen actividad efectiva sobre aquellos microorganismos poseedores de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) como los bacilos Gram negativos, principalmente enterobacterias. Las cepas productoras de BLEE generalmente son multiresistentes, sobre todo a los beta-lactámicos, estas *BLEE* son capaces de inactivar, además de las penicilinas, a las cefalosporinas de primera y segunda generación. Este mecanismo de resistencia es transferible no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre diferentes especies bacterianas (Hernández *et al.*, 2006). Este punto podría explicar las frecuencias de resistencia observada hacia los beta-lactámicos en los aislados de estudio, pero se requieren estudios moleculares que permitan identificar si poseen este tipo de enzimas.

Por otro lado se obtuvieron aislados multiresistentes. Por ejemplo, los aislados de las especies *A. gandavensis*, *C. aquilae* y *P. aeruginosa*, presentaron resistencia a más del 50% de los antimicrobianos probados. Estos patrones de resistencia en la mayoría de las veces se asocia a la integración de nuevas enzimas obtenidas mediante conjugación, transformación o transducción (Navarro *et al.*, 2010), lo que permite que entre bacterias de la misma especie o especies distintas se transfieran genes de resistencia lo que facilita la expansión epidémica de la misma.

En lo referente a *M. bovoculi* y su comportamiento fenotípico de resistencia, Sosa (2013) encontró resistencia a cloranfenicol, nitrofurantoina y sensibilidad a cefalotina, mientras que Angelos *et al* (2011) no evaluó a cefalotina; sin embargo,

identificó resistencia a penicilina y sensibilidad a ampicilina. En el presente estudio de los tres casos con QIB, los casos 5 y 11 de diferente región geográfica fueron resistentes a ampicilina y cefalotina, mientras que el caso 12 de la misma región geográfica que el número 11 presentó sensibilidad intermedia a ampicilina y cefalotina. Los patrones de resistencia diferentes pueden indicar las preferencias por el empleo de antimicrobianos para tratar QIB en cada región (Loy y Brodersen, 2014).

¿*M. bovis* o *M. bovoculi* o ambas están involucradas como agente causal de QIB?

M. bovis y *M. bovoculi* son obtenidas de ojos sanos en bovinos y con mayor frecuencia en ojos con QIB (O'Connor, 2012). El agente etiológico que hasta este momento se ha comprobado que causa QIB es *M. bovis* (O'Connor *et al.*, 2012; Dickey *et al.*, 2016; Merck, 2016). *M. bovoculi* se ha aislado en casos de QIB en diferentes especies, en bovinos (Angelo *et al.*, 2007c; Sosa *et al.*, 2013; Libardoni, 2012), en renos (Tryland *et al.*, 2009) y en caballos de carrera (Liu, 2014).

En el presente estudio no se identificó a *M. bovis*, situación que pudiera atribuirse al reducido número de animales muestreados, o bien, a que la frecuencia de aislamiento es mayor en animales con cuadro clínico incipiente a diferencia de los que están al final del proceso (Turquieto *et al.*, 2008), otra posibilidad es la ausencia de esta bacteria (Angelos, 2010a). Sin embargo, en este estudio se identificaron tres aislados cuya secuencia del gen ARNr 16S fue homóloga a la de la cepa 237 de *M.*

bovoculi, que fue obtenida por primera vez a partir de ojos ulcerados de becerros con QIB en el norte de California, EU en el año 2002 (Angelos y Ball, 2007b).

Recientemente Dickey *et al* (2016) aislaron a *M. bovoculi* de casos clínicos de ojos en bovinos con QIB y de nasofaringe de vacas sin signología, identificándose que la estructura del genoma, contenido genético y su polimorfismo era diferente, concluyendo que se trataba de dos grupos filogenéticamente distintos y en consecuencia se asume que existen diferentes cepas de *M. bovoculi* que pueden no asociarse a QIB. Sosa y Zunino (2013) describen la diversidad genética de *M. bovoculi* y *M. bovis* asociada a QIB en Uruguay, así como sus genes de virulencia, identificando que ambas especies pudieran tener diferentes propiedades patógenas (Sosa *et al.*, 2015).

Esta investigación es la primera que se documenta en Michoacán y en México, si bien, aporta información valiosa, se considera que fue limitada por incluir pocos hatos de algunas localidades, sin embargo, es el inicio de una amplia e interesante investigación en Michoacán sobre QIB.

VII.CONCLUSIONES

En el presente estudio el porcentaje de animales con QIB fue 2.23% y se identificó a *M. bovoculi* como posible agente etiológico, este comentario se fundamenta en los estudios publicados por diferentes autores que han invertido varios años en tratar de establecer cómo es que esta bacteria participa en la patogénesis de QIB, siendo hasta este momento incierto, si bien, solo fueron tres bovinos en donde se obtuvo a *M. bovoculi*. Es necesario realizar un muestreo más exhaustivo para descartar que *M. bovis* no está ocasionando esta enfermedad.

PERSPECTIVA

Se requiere establecer los mecanismos epidemiológicos para obtener información referente a la incidencia de QIB en Michoacán en las diferentes estaciones del año, identificar la microflora ocular en bovinos sanos, la frecuencia de aislamiento del género *Moraxella* en animales sanos y en QIB, por mencionar algunos campos a investigar.

Es necesaria mayor investigación sobre la etiología de QIB que permita poseer los conocimientos inmunológicos y en un futuro elaborar las bacterinas eficaces contra QIB, medida que se espera disminuirá la incidencia de la enfermedad y en consecuencia los gastos que genera su tratamiento, y un aspecto muy importante, se estará contribuyendo al bienestar animal.

VIII. ANEXOS

7.1 Cuestionario de casos con Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina

Fecha_____Localidad_____Rancho_____

Propietario_____

Persona entrevistada y cargo_____

Finalidad zootécnica_____Sistema de producción_____

Raza(s)_____Número de animales_____

¿Vacuna a sus vacas y qué tipo de vacunas son o contra que enfermedades vacuna?

¿Se presenta alguna enfermedad que afecte los ojos de las vacas?

¿Me podría describir que lesiones oculares que ha identificado?

¿Cuántos animales se ven afectados cuando se presenta la enfermedad?

¿Son similares las lesiones en todos los animales?

¿Qué edad tienen los animales que más comúnmente se enferman?

¿En qué época del año se presenta la enfermedad?

¿Realiza algún estudio de laboratorio para conocer que microorganismo está causando la enfermedad?

¿Consulta al médico veterinario para atender los animales enfermos?

¿Cómo trata a los animales enfermos?

¿En promedio cuánto gasta por animal para tratarlo?

¿Sabía usted que se puede disminuir la presentación de la enfermedad al vacunar a los animales?

¿Cree conveniente que se hagan estudios de laboratorio para conocer al microorganismo que causa la enfermedad?

7.2 Expediente clínico de casos con Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina

EXP. No. _____
FECHA: ____ _

RANCHO/GRANJA _____
DIRECCIÓN: _____
TELÉFONO: _____

NUMERO DE ANIMALES: _____ IDENTIFICACIÓN: _____
ESPECIE: _____ DIETA: _____
RAZA: _____
SEXO: _____ SISTEMA DE PRODUCCIÓN _____
EDAD: _____ NUMERO DE ANIMALES AFECTADOS _____
COLOR: _____ PESO _____

INMUNIZACIONES:

FECHA	FECHA
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

HISTORIA CLÍNICA

DESCRIPCIÓN SECUENCIAL DE LA
PRESENTE AFECCIÓN

7.3 Preparación de medios de cultivo

Medio sólido de agar sangre

Se requiere para su preparación de base de agar en sangre (Bioxon, México) a éste se le agrega agua desionizada y se esterilizó a vapor bajo presión a 15 lb por 15 minutos. Una vez atemperada esta solución y en campana de flujo laminar se añadió sangre de ovino al 4% homogenizando los tres constituyentes para finalizar con la distribución del líquido en las cajas de petri.

Medio de caldo Luria Bertani (LB)

El cado LB se compone de cloruro de sodio (5 g), peptona (5 g) y extracto de levadura (10 g), mismos que se diluyen en 1 litro de agua desionizada, posteriormente se esteriliza.

Medio sólido de agar Mueller Hinton (MH)

Para preparar 1000 ml se requiere 38 gr de base de agar Muller Hinton, que se diluyen en agua desionizada y se esterilizan con vapor a presión continuando con la distribución en cajas de petri.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addison B (2011). Research shows new emerging strain of pinkeye.
www.ProgressiveDairy.com 25 (7):58-60. Fecha de consulta: 15 de febrero 2015.
- Angelos J, Hess J y George L. (2003). An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. Vet Microbiol. 92(4):363-377.
- Angelos JA, Bonifacio RG, Ball LM, Hess JF. (2007a). Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* pilin-*Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. Vet Microbiol. 125(3-4):274-83.
- Angelos JA, Ball LM (2007b). Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid moraxellae by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J Vet Diagn Invest. 19(5):532-534.
- Angelos JA, Spinks PQ, Ball LM, George LW (2007c) *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. Int J Syst Evol Microbiol. 57:789-795.
- Angelos, J. y Ball, L. (2007d). Relatedness of cytotoxins from geographically diverse isolates of *Moraxella bovis*. Veterinary Microbiology 124.
- Angelos JA (2010a). *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Cause or Coincidence? Vet Clin Food Anim 26:73–78.
- Angelos JA, Lane VM, Ball LM, Hess JF(2010). Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet Res Commun. 34(3):229-239.
- Angelos JA, Ball LM, Byrne BA (2011). Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. J Vet Diagn Invest. 23(3): 552–555.
- Angelos J (2012). Pathogenesis of *Moraxella bovoculi* sp. Nov in bovine infection. University of California, Davis.REEIS. USDA.
- Acquistapace S. (2014). Proteínas de membrana externa de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* como componentes de vacunas contra la queratoconjuntivitis bovina. Tesis de grado de licenciatura en bioquímica. Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo-Uruguay.

Atwell J, Tennent J, Lepper A. & Elleman T. (1994). Characterization of pilin genes from seven serologically defined prototype strains of *Moraxella bovis*. Journal of Bacteriology, 176, n16, p 4875-4882.

Base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/>). Fecha de consulta: 15 de junio de 2016.

Baptista PJ. (1979). Infectious bovine Keratoconjunctivitis, a review. Br . Vet. J. 135 (3): 225-242.

Blood DC, Radostits OM. (1992) Enfermedades causadas por bacterias. En Medicina Veterinaria. Séptima edición. Vol I. Madrid Interamericana. McGraw-Hill, 750-753.

Bradford PA (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev. 14(4): 933–951.

Bretschneider G y Pérez SE.(1996). Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina: Tipos de vacunas y su evaluación. Tesina de grado. FCV-UNCPBA Tandil. 1-56.

Brown MH, Brightman AH, Fenwick BW, Rider MA. (1998). Infectious bovine Keratoconjunctivitis: a review. Vet. Intern. Med. 12(4):259-66.

Caspari BL, Wood DP and Newton JM. (1980). Eyelid pigmentation and the incidence of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in Hereford-Frisean crossbred calves. Br. Vet. J. 136 (3): 210-213.

Censo Agropecuario 2007 - INEGI. www.inegi.org.mx/est/contenidos/.../Agro/ca2007. Fecha de consulta: 18 de marzo de 2014.

Cortinas C. (2014). Estudio de la hemolisis y proteínas de membrana externa de cepas de *Moraxella* ssp. recuperadas de casos de queratoconjuntivitis infecciosa bovina en Uruguay. Tesina de grado de licenciado en Ciencias Biológicas. Laboratorio de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Uruguay.

Dickey AM, Loy JD, Bono JL, Smith T.P.L., Apley, MD, Lubbers BV, DeDonder KD, Capik SF, Larson RL, White BJ, Blom J, Chitko-McKown CG., Clawson ML. (2016).

Large genomic differences between *Moraxella bovoculi* isolates acquired from the eyes of cattle with conjunctivitis versus the deep nasopharynx of asymptomatic cattle. Vet Res. 47(31):1-11

Frank SK, Gerber JD(1981). Hydrolytic enzymes of *Moraxella bovis*. J Clin Microbiol. 48: 315-324.

Fulks K, Marrs C, Stevens S, Green M. (1990). Sequence analysis of the inversion region containing the pilin genes of *Moraxella bovis*. J. of Bacteriol. 172: 310-316.

Funk L, O'Connor AM, Maroney M, Engelken T, Cooper VL, Kinyon J, Plummer P(2009). A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. Vaccine. 27(34):4585-4590.

Galvão KN, Angelos JA. (2010). Ulcerative blepharitis and conjunctivitis in adult dairy cows and association with *Moraxella bovoculi*. Can Vet J. 51(4):400-402

Gasque R. (2008). Queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Enciclopedia Bovina. Enfermedades de los bovinos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/ Fecha de consulta:12 de enero 2015

Gerhardt RR, Allen JW, Greene WH. (1982). The role of face flies in an episode of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. J Am Vet Med Assoc. 180(2):156-159.

Gil TC, Araújo FL. (1982). Serological characterization of strains of *Moraxella bovis* using double immunodiffusion. Can J Comp Med. 46:165-168

Giraud P. (2005). Control de la queratoconjuntivitis. Producir XXI, Bs.As., 14(169):35-38. www.produccion-animal.com.ar Fecha de consulta: 13 de agosto 2014.

Handool H. (2013) Isolation and identification of some genera and species of bacteria and fungi from conjunctiva in cattle in Al-Diwaniya city. AL-Qadisiya Journal of Vet.Med.Sci. 12(2):55-62.

Hare WR, Hoyt PG, Hohn C, Higgins JA. (2008). Ribosomal RNA-based analysis of the bacterial flora from the conjunctivae of cattle with bovine keratoconjunctivitis (BKC). Vet Microbiol. 131:358-368

Hernández W, Ramos A, Nodarse R, Padrón A, De Armas E. (2006). Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). Rev Cub Med Int Emerg 5(1):256-264.

Hernández P, Quintero G.(2003). Etiología bacteriana de infecciones oculares externas. Nova - publicación científica issn:1794-2370 1(1): 1-116.

Infante FM, Flores G, Falcón NA e Infante AF. (2000). Control de un brote de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina mediante el control de las moscas en estadio larvario. MedVet 17: 273-276.

Kirkpatrick JG, Lalmar D. (1997). Conjuntivitis en el ganado queratoconjuntivitis infecciosa bovina (IBK). Online. Disponible en: <http://vetgate.ac.uk>. Fecha de consulta: 14 de enero 2015.

Lepper AW, Hermans LR. (1986). Characterization and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. Aust Vet J. 63: 401-405.

Libardoni F, Scherer Ch, Farias L, Vielmo A, Balzan C, Vargas A (2012). *Moraxella bovoculi* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis in Rio Grande do Sul, Brazil. Pesq. Vet. Bras. 32 (8): 743-746.

Liu H, Yan J, Wang Y, Yan Q, Zhao L, Yan R, He H. (2014). Isolation of *Moraxella bovoculi* from racehorses with keratoconjunctivitis. J Vet Diagn Invest. 26(4):585-587

Loy JD, Brodersen BW. (2014). *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. J Vet Diagn Invest. 26(6):761-768.

Martirena MJ, Turrens M. (2013). Descripción clínica de las lesiones oftalmológicas, producidas en un brote de queratoconjuntivitis bovina infecciosa en terneros de destete precoz. Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.

Merck Veterinary Manual.(2016). Overview of Infectious Keratoconjunctivitis. Eleventh edition. Merck&Co, Inc Edit. Kenilwort,NJ, USA.

Minatel L y Corbellini C. (2007). Efecto de la deficiencia de cobre sobre el desarrollo de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina en terneros desafiados experimentalmente con *Moraxella bovis*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Área de Patología Básica.; 1-101.

More LJ, Rutter JM. (1987). Antigenic analysis of fimbrial proteins from *Moraxella bovis*. J Clin Microbiol 25: 2063-2070.

Nanclares DA. (2016). Evaluación de las bacterias aisladas de material particulado PM2.5 captado en tres estaciones de la Red de Monitoreo de Calidad de Aire del Área Metropolitana Valle de Aburrá. Tesis de Magíster. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Minas, Escuela de Geociencias y Medio Ambiente Medellín, Colombia.

Navarro F, Miró E, Mirelis B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 28(9):638–645.

O'Connor AM, Shen HG, Wang C, Opriessnig T (2012). Descriptive epidemiology of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (Pinkeye). Vet Microbiol.155:374-380.

Odeón A, Paolicchi F, Cambessies G y Margueritte J. (2006). Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/ojo/83-queratoconjuntivitis.htm. Fecha de consulta: 12 de septiembre de 2014.

Ochoa A, Loeza P, Torres F, Loeza H, Mascot N, Sánchez S and López JE (2008). Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard system. Antonie van Leeuwenhoek 94:199–206.

Postma GC, Carfagnini JC; Minatel L. (2008). *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. Science Direct 31: 449-458

Prieto CI, Boch A, Zielinsky G, Cúneo, J, Yantorno O M. (2008). Vaccine against infectious bovine keratoconjunctivitis: A new approach to optimize the production of highly pilated *Moraxella bovis* cells. Vaccine 26: 6542-6549.

Pugh GW and McDonald TJ. (1986). Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examination of ocular and nasal secretions. Am J Vet Res 47:2343-2347.

Rochedo F, Gil C. (2003). *Moraxella bovis*: influencia de las características genotípicas y fenotípicas de control de queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Ciencia Rural. Santa Maria. 33(4): 779-788.

Rodriguez JE, Hassen A, Tait RG and Reecy JM. (2006). IBK (pinkeye) in Black Angus Cattle. Iowa State Research Farm Progress Reports. Paper 889. http://lib.dr.iastate.edu/farms_reports/889. Fecha de consulta: 18 de febrero 2015.

Sánchez G, Sánchez A. (2005). La Ganadería Bovina del Estado de Michoacán. www.siac.org.mx/tecnos/19mich.pdf Fecha de consulta: 28 de marzo de 2015.

Sosa V, Zunino P. (2013). Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine Keratoconjunctivitis cases in Uruguay. J Infect Dev Ctries 7(11):819-824

Sosa V, Umpierrez A, Acquistapace S, Zunino P. (2015). Virulence genes in *Moraxella* spp. isolates from infectious bovine keratoconjunctivitis cases. J Infect Dev Ctries. 9(9):1028-1032.

Sosa V. (2013). Bases Microbiológicas de la Queratoconjunctivitis Infecciosa Bovina en Uruguay. Tesis de doctorado PEDECIBA. Área Biología, subárea Microbiología. Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo-Uruguay.

Spradbrow PB. (1967). A microbiological study of bovine conjunctivitis and Keratoconjunctivitis. Aus Vet J 43(2):55-58

Tryland M, Das Neves CG, Sunde M, Mork T. (2009). Cervid herpesvirus 2, the primary agent in an outbreak of infectious keratoconjunctivitis in semidomesticated reindeer. J Clin Microbiol 47:3707-3713.

Turquieto E, Chayer R, Jorge MC and Passucci J. (2008). Queratoconjunctivitis bovina actualización y análisis de casos entre 2002 y 2006 en Argentina. Disponible en el URL: www.produccion-animal.com.ar Fecha de consulta: 13 de mayo de 2014.

Zamora, Q. MA; Aguilar A, Jeny; Sumano L. (2010). Eficacia clínica del florfenicol oftálmico vs florfenicol parenteral en el tratamiento de queratoconjunctivitis infecciosa bovina. Revista Vet. Méx., 41 (3): 219-225.

Zocco N, Larsen RM, Di Santo, M I, Pérez S. (2010). La Queratoconjunctivitis Bovina y su Incidencia en la Producción. Tesina de la Orientación Producción de Bovinos de Carne. Buenos Aires, Argentina.

Zunino P. y Sosa V. (2008). Diversidad de *Moraxella* spp. y queratoconjuntivitis infecciosa bovina en Uruguay. Depto. de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Uruguay.

Wilcox GE. (1970). Bacterial flora of the bovine eye with special reference to the *Moraxella* and *Neisseria*. Aust Vet J. 46(6):253-256