



**Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata**

Trabajo final:

**“Evaluación de parámetros hematológicos en
terneros desafiados experimentalmente con
Mannheimia haemolytica”**

Autor: M.V. Arriaga Guido José.

Directora: M.V. Pretti Romina

Codirector: Dr. Luis Emilio Fazzio

27 de febrero de 2020

Índice

Introducción.....	3
Material y métodos.....	5
Resultados.....	8
Discusión.....	12
Conclusión.....	14
Bibliografía.....	15

Introducción

La enfermedad respiratoria bovina (ERB) es una de las entidades más importantes que afecta a bovinos en la etapa de crecimiento (Kelly and Janzen 1986; Costa y col., 2003; Schunicht y col., 2007, Galván y col., 2014) y causa importantes pérdidas económicas por disminución en la ganancia diaria de peso, incremento en días hasta llegar a peso de faena, disminución en la calidad de la carcasa y pérdidas por muerte (Thompson y col., 2006).

La ERB resulta de una compleja interacción entre agentes infecciosos, estrés y susceptibilidad individual (Radostits y col. 2002). Está ampliamente aceptado que el estrés es la condición *sine qua non* para la aparición de la ERB. En el inicio del período de engorde a corral (EC) y la etapa de cría/recría en explotaciones de lechería, se presentan numerosos factores considerados estresantes; como la reorganización social del grupo de animales que comparte cada corral/potrero (Cusack y col., 2003), transporte (Johnson, 1985), cambio de dieta (Cusack y col., 2003) y variaciones en el manejo (Irwin, 1979) entre otros.

Entre los agentes infecciosos involucrados en la ERB se incluyen virus y bacterias. De los agentes virales más comúnmente reportados destacan virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), virus parainfluenza 3 bovino (PI-3), herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) y virus de la diarrea viral bovina (VBDV). Al conocimiento actual, se reconoce que los tres primeros afectan los mecanismos de defensa del sistema respiratorio (Doherty y col. 2001; Keita y col., 2007), mientras que al último se le atribuye un efecto inmunodepresor, con disminución de la respuesta humoral, menor atracción quimiotáctica de monocitos y alteración del sistema mieloperoxidasa en los polimorfonucleares neutrófilos (Roth y col., 1981). Entre los agentes bacterianos más comúnmente asociados a cuadros clínicos de ERB se incluyen *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus* spp. y *Mycoplasma* spp. (Keita y col., 2007, Rice y col., 2007) entre otros. De todos ellos, *P. multocida* y *M. haemolytica* son los microorganismos más frecuentemente aislados de los hisopados nasofaríngeos y de las muestras obtenidas en las necropsias (Cusack y col., 2003, Keita y col., 2007, Rice y col., 2007, Dabo y col., 2007, Fazzio y col 2010, Fazzio y col. 2015).

Mannheimia haemolytica es considerada un habitante normal -comensal- de la nasofaringe bovina y un patógeno oportunista en enfermedades del tracto respiratorio inferior. Esta bacteria, cumple un rol muy importante en la ERB, debido a su alta capacidad para expresar factores de virulencia tales como adhesinas, polisacáridos

capsulares, fimbrias y una leucotoxina específica para rumiantes considerada esencial en la patogénesis de la enfermedad, además de ser la responsable de la mayor parte del daño pulmonar (Singh y col. 2010).

El desafío experimental con *M. haemolytica* en bovinos estimula el desarrollo de respuestas tanto locales, por parte del tejido pulmonar (Singh y col. 2010), como sistémicas. Así, se describen variaciones en las concentraciones séricas o plasmáticas de las proteínas de fase aguda como la haptoglobina, amiloide sérico A (SAA) y fibrinógeno, entre otros (Hanzlicek, G. A., y col, 2010; Ganheim y col., 2003) y cambios en los valores hematológicos en la etapa aguda de la infección (Mike y col., 1987; Ganheim y col., 200; Taylor, 2000).

En este contexto el análisis de sangre, resulta de utilidad no solo para evaluar trastornos hematológicos, sino también para caracterizar enfermedades que afectan diversos órganos o procesos patológicos sistémicos. Además, aporta valiosa información en el diagnóstico y pronóstico respecto del futuro y de la progresión de una enfermedad en un individuo o población (Leonie Ronald y col, 2014).

El presente trabajo se propone como objetivo conocer las variaciones de los parámetros hematológicos en terneros desafiados experimentalmente con *M. haemolytica*.

Material y Métodos

Todos los procedimientos realizados en el presente ensayo fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata. Registrado en el Protocolo para el Uso de Animales de Investigación Científica (Identificación interna N° 55-2-18P).

Establecimiento y animales:

El estudio experimental, se realizó en instalaciones del Hospital Escuela de Grandes Animales de la FCV-UNLP, e incluyó 10 terneros machos, raza Holando Argentino de entre 67 y 80 días de vida, con un peso promedio de 68 ± 9 kg.

Identificación:

Al momento del arribo, los animales se identificaron con caravana numerada individual, que se adosó al collar de cada animal.

Alojamiento y período de adaptación:

Al llegar los animales a las instalaciones del Hospital Escuela, permanecieron en un potrero especialmente preparado para recibirlos, en sistema de estaca individual, con balde de alimento y de bebida durante el día.

Criterio de inclusión al estudio:

Previo al comienzo del ensayo se realizó la evaluación clínica y la extracción de sangre de cada animal encontrándose tanto los parámetros clínicos como los hematológicos dentro de los valores de referencia según edad y especie (Love y col. 2016,

https://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/8calf/calf_respiratory_scoring_chart.pdf ; Kramer, 2000).

Alimentación:

Los animales recibieron heno de alfalfa y alimento balanceado comercial racionado al 2 % de su peso corporal sobre base seca que se les suministró dos veces por día: el 60 % de la ración diaria a las 8.00 h mientras que el 40 % restante a las 15 h. La composición centesimal del alimento balanceado se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Composición del alimento balanceado suministrado en los días previos y durante el ensayo*.

Componente	% Mínimo	Componente	% Máximo
Extracto etéreo	1,8	Fibra cruda	20
Proteína bruta	17	Humedad	18
Calcio	0,58	Minerales totales	15
Fósforo	0,55	Fósforo	2

* Ajustado al 2 % del peso corporal de cada animal en base seca.

Diseño experimental:

Formación de grupos e inoculación experimental:

Los 10 animales se dividieron en dos grupos, completamente al azar. Un grupo recibió el inóculo bacteriano (GI, n=5) mientras que el otro grupo, permaneció como control (GC, n=5) y recibió solución fisiológica estéril.

La inoculación experimental (considerado como “día 0” del ensayo) se realizó a las 08:00 am, con una cepa de *M. haemolytica*. (aislada de un caso de campo), a una concentración de $4,56 \times 10^6$ colonias por mililitro, en fase logarítmica de crecimiento, en medio de cultivo líquido (8 ml totales). El inóculo se introdujo mediante endoscopio y se descargó a la altura de la bifurcación de la tráquea (4 ml en bronquios derecho e izquierdo respectivamente).

Evaluación clínica:

El examen clínico de los animales luego de la inoculación experimental se realizó según los criterios propuestos por el “Método Wisconsin para diagnóstico de Enfermedad Respiratoria en bovinos de leche”. El mencionado método, utiliza el registro/observación directa de temperatura corporal rectal, secreciones nasales y oculares, posición de las orejas y reflejo tusígeno, para determinar la condición de enfermo (SI/NO). La puntuación de la enfermedad respiratoria resulta de la suma de puntos de las 5 categorías de signos clínicos, con valores crecientes que representan severidad progresiva. El puntaje registrado alcanza un valor mínimo de 0 y un máximo de 13 (Love y col. 2016).

La evaluación clínica se realizó en la hora 0 (previo a la inoculación experimental) y 9, 24, 48, 72, 96 y 120 post inoculación (PI). Se tomó como punto de corte el score 5. De este modo, aquellos terneros con valores de 5 o superior fueron considerados clínicamente enfermos.

Estudio hematológico:

Se obtuvieron muestras de sangre para hemograma mediante venopunción yugular, en tubos acondicionados especialmente con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante. Las extracciones se realizaron en la hora 0 (previo a la inoculación experimental) y 9, 24, 48, 72, 96 y 120 horas PI. Una vez recolectadas las muestras, cada tubo se identificó individualmente y se conservó a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 6 horas post extracción.

El recuento de glóbulos blancos (GB) se realizó por el método manual a través de la cámara cuenta glóbulos de Neubauer, utilizando ácido acético glacial al 3 % con una gota de azul de metileno. Se realizó un frotis sanguíneo que se tiñó con metanol/Giemsa, (Ióvine y Selva, 1985) y se observó, usando aceite de inmersión, con el objetivo de 100X, realizando el recuento diferencial de 100 células. (Meyer y Harvey, 2000).

La medición del hematocrito se llevó a cabo mediante la técnica manual (microhematocrito), a través de un microcentrífuga, durante 5 min a 12000 rpm, por medio de tubos capilares de vidrio, y los resultados se interpretaron en el lector de hematocrito (ábaco).

Análisis estadístico:

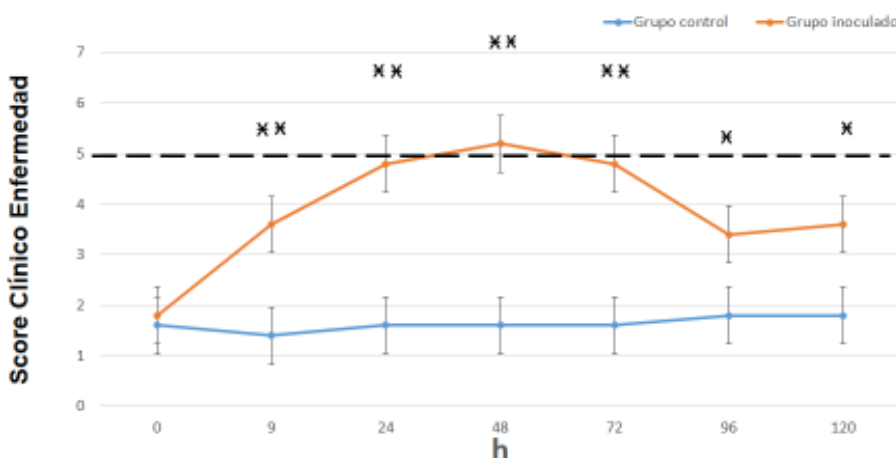
Para el análisis de datos se utilizó un modelo mixto del programa estadístico SAS (Académico). El modelo incluyó el efecto aleatorio del animal (unidad experimental), y los efectos fijos del tiempo (0 vs. 9 vs. 24 vs. 48 vs. 72 vs. 96 vs. 120 horas), tratamiento (GI vs. GC), y la interacción correspondiente (tiempo x tratamiento). En los casos en que se observó diferencia en los efectos principales, se utilizó la opción SLICE (dentro del mismo programa estadístico) para determinar diferencias en cada uno de los tiempos. Se consideró estadísticamente significativo al valor de $p < 0,05$, mientras que el valor de $p < 0,10$ se lo valoró como tendencia.

Resultados

No se registraron animales muertos. Durante el ensayo se obtuvieron las muestras y se registraron los parámetros preestablecidos de todos los animales.

El score clínico evidenció diferencias entre los grupos GI y GC. El GI presentó marcado aumento del score clínico (enfermedad clínica) observándose diferencias significativas ($p < 0,008$) en los distintos momentos del ensayo (**Figura 1**).

Figura 1. Score clínico en terneros del grupo inoculado y grupo control, durante el ensayo (120 h, n=10)



Grupo inoculado: animales inoculados experimentalmente con una cepa de *M.haemolytica*. (8 ml. totales a una concentración de 4.56×10^6 colonias por mililitro, en fase logarítmica de crecimiento, en medio de cultivo líquido) por vía endoscópica (n=5).

Grupo control: animales inoculados experimentalmente con 8 ml de solución fisiológica estéril por vía endoscópica (n=5).

--- valor considerado límite para tratamiento terapéutico. (Método Wisconsin para diagnóstico de Enfermedad Respiratoria en bovinos de leche).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ entre grupo (opción SLICE, SAS)

En el recuento de GB se observó diferencia entre los grupos en el recuento total de leucocitos a las 9 y 24 h PI, $p = 0,002$ y $p = 0,001$ respectivamente (**Figura 2**). En el mismo sentido el recuento de neutrófilos en banda y segmentados, mostró diferencias significativas entre los grupos a las 9 y 24 h PI ($p = 0,0001$), observándose neutrofilia con desvío a la izquierda (**Figura 2**). Los valores de neutrófilos en banda se mantuvieron por encima de los valores normales (valores de referencia: 0-120 células/ μ l de sangre) entre

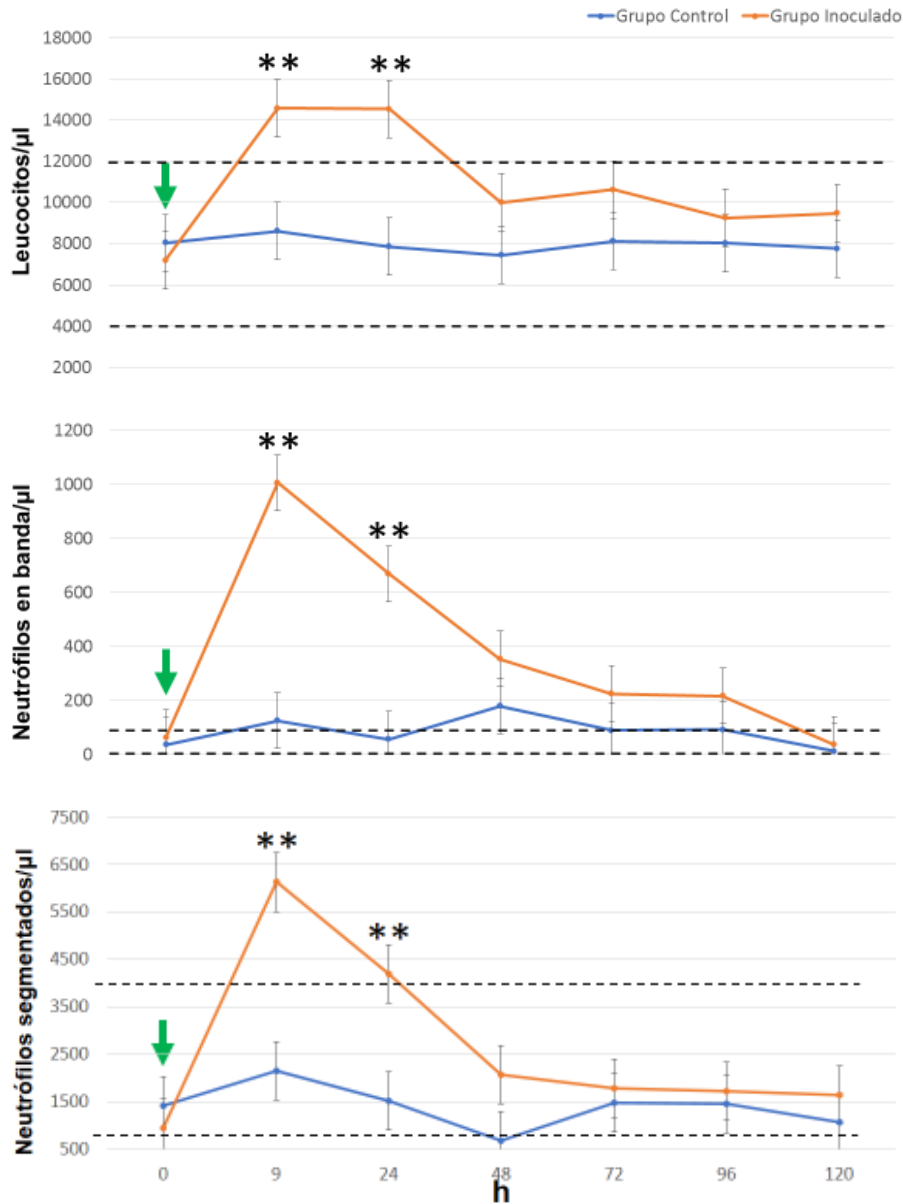
las 48 y 72 h PI. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (**Figura 2**). En el caso de los neutrófilos segmentados, disminuyeron luego a las 48 h PI quedando dentro del rango considerado normal y de referencia (**Figura 2**).

En la lectura del frotis sanguíneo, el GI evidenció cambios tóxicos en los neutrófilos (al menos un 10 % de neutrófilos con citoplasma vacuolado/espumoso) en diferentes momentos (9, 24 y 48 h PI). No se identificaron cambios tóxicos en los neutrófilos en el GC (**Tabla 2**).

En el recuento de linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y en el valor de hematocrito no se observaron diferencias entre los grupos ($p > 0,05$). Los valores se mantuvieron dentro de los rangos considerados normales y de referencia durante todo el ensayo.

La fórmula leucocitaria relativa se vio modificada solamente en el GI, en las primeras 24 h PI, con valores de 49 y 51 %, para neutrófilos y linfocitos respectivamente.

Figura 2. Leucocitos totales, neutrófilos en banda y neutrófilos segmentados en terneros del grupo inoculado y control durante el ensayo (120 h, n=10).



Grupo inoculado: animales inoculados experimentalmente con una cepa de *M. haemolytica*. (8 ml. totales a una concentración de 4.56×10^6 colonias por mililitro, en fase logarítmica de crecimiento, en medio de cultivo líquido) por vía endoscópica (n=5).

Grupo control: animales inoculados experimentalmente con 8 ml de solución fisiológica estéril por vía endoscópica (n=5).

Flecha momento de inoculación, vía endotraqueal, día 0.

--- valores considerados normales y de referencia para la edad y especie animal.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ entre grupo (opción SLICE, SAS)

Tabla 2. Cambios tóxicos observados en neutrófilos durante el ensayo (120 h, n=10)*.

	Horas						
	0	9	24	48	72	96	120
Grupo Inoculado	0/5	3/5	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5
Grupo Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Grupo inoculado: animales inoculados experimentalmente con una cepa de *M.haemolytica*. (8 ml. totales a una concentración de 4.56×10^6 colonias por mililitro, en fase logarítmica de crecimiento, en medio de cultivo líquido) por vía endoscópica (n=5).

Grupo control: animales inoculados experimentalmente con 8 ml de solución fisiológica estéril por vía endoscópica (n=5).

* El numerador indica la cantidad de animales con recuento mayor al 10 % de cambios tóxicos en neutrófilos/ el denominador indica la cantidad de animales evaluados por grupo.

Discusión

Los parámetros leucocitarios al igual que el *score* clínico de enfermedad respiratoria bovina sufrieron modificaciones luego de la infección experimental con *M. haemolytica*. Dicha infección modificó el valor de leucocitos totales, en banda y segmentados. En las primeras 9 y 24 h PI se observó un significativo, pero transitorio, aumento de los neutrófilos segmentados y en banda (neutrofilia con desvío a la izquierda), propio de la fase aguda de infección. A las 48 h PI, los neutrófilos segmentados evidenciaron un marcado descenso a valores considerados dentro del rango normal, mientras que el número de neutrófilos en banda descendió más lentamente persistiendo por encima de los valores normales hasta casi el final del periodo experimental. Al observar comparativamente el recuento de neutrófilos y los valores del *score* clínico resultó evidente que, en el momento en que los animales manifestaron mayor *score* clínico (48 h PI), el número de neutrófilos segmentados en sangre disminuyó y alcanzó valores de normalidad. Es probable que el rápido descenso de la neutrofilia se haya debido al secuestro de neutrófilos en el parénquima pulmonar, sitio de la infección y lugar de actuación de estas células en el desarrollo de una respuesta inflamatoria, la que se tradujo en signos clínicos de enfermedad. Similares resultados fueron obtenidos por investigadores que realizaron infecciones experimentales con la misma bacteria (Mike y col., 1987; Ganheim y col., 2005). Sin embargo, otro autor (Taylor, 2000), observó neutropenia en las primeras horas PI, como consecuencia de un reclutamiento de neutrófilos desde la sangre al sitio de inflamación y una movilización más lenta de glóbulos blancos desde la médula ósea. En general, durante la infección y la inflamación, es esperable que la producción de neutrófilos aumente en respuesta a las citoquinas y factores de crecimiento que se producen en los tejidos afectados (Valli y col 2016). En estas circunstancias, si la demanda tisular de neutrófilos excede el pool de almacenamiento, la médula ósea libera neutrófilos en banda inmaduros, metamielocitos y otras formas inmaduras llevando a la neutrofilia con desvío a la izquierda, que es lo que se observó en nuestra experiencia. El grado de desvío a la izquierda es proporcional a la magnitud y al curso agudo de la inflamación (Valli y col 2016). Por otro lado, debe tenerse en cuenta que los bovinos poseen una capacidad más limitada de almacenamiento y de movilización de neutrófilos desde la médula ósea que las especies no rumiantes (Valli y col 2016). Y esto hace que en un cuadro de inflamación aguda grave de origen bacteriano, la respuesta primera sea la de una neutropenia, como la observada por Taylor 2000, más que neutrofilia. En nuestro trabajo, a diferencia de lo realizado por Taylor, se

utilizó un menor volumen de inóculo y de UFC por mililitro para la infección experimental con lo que probablemente la respuesta inflamatoria inducida haya sido menor y la transitoria neutrofilia con desvío a la izquierda observada haya resultado suficiente para aportar neutrófilos al sitio de infección (parénquima pulmonar). Los cambios tóxicos en los neutrófilos son probablemente las alteraciones morfológicas más frecuentes detectadas en frotis de sangre, y representan además la severidad o grado de alteración. Estos cambios celulares son el resultado de una granulopoyesis aberrante e indican un efecto sistémico inflamatorio sobre la médula ósea. Los cambios más severos se observan principalmente en animales con sepsis, endotoxemia o necrosis tisular (Zabolotzky y Walker, 2014). En el presente ensayo, los cambios tóxicos se observaron solo en las 9, 24 y 48 horas PI en el GI, y consistieron en neutrófilos con citoplasma de aspecto espumoso con vacuolas definidas, dando una apariencia similar a burbujas. Este cambio es indicativo de toxicidad sistémica grave y se considera el resultado de la formación anormal de lisosomas y liberación intracelular de enzimas autolíticas (Zabolotzky and Walker, 2014). Otros cambios tóxicos descritos, son los cuerpos de Döhle, basofilia citoplasmática, granulación tóxica y neutrófilos gigantes, entre otros (Zabolotzky and Walker, 2014; Meyer and Harvey JW, 2000). Ninguno de estos últimos cambios fue observado en el presente ensayo.

En cuanto a los linfocitos presentes en sangre, no se encontraron diferencias entre muestreos y grupos durante todo el ensayo. Sin embargo, otros autores en condiciones experimentales similares, observaron linfopenia a las 6 horas PI (Mike y col., 1987; Ganheim y col., 2005). La linfopenia a menudo acompaña a las infecciones bacterianas, virales y sistémicas graves debido a la liberación de corticoides endógenos (Meyer y Harvey, 2000). Se conoce que los linfocitos son secuestrados en la médula ósea, en los ganglios linfáticos y en el bazo por acción de glucocorticoides endógenos o exógenos (Meredyth y col. 2007). Del mismo modo que lo mencionado para la neutropenia, posibles razones que expliquen estas diferencias podrían ser que, en estos ensayos experimentales, se utilizó mayor volumen de inóculo y una mayor cantidad de UFC por mililitro que en nuestro ensayo. En este sentido Mike y col (1987) utilizó un único inóculo de 25 ml de $1,2-2,6 \times 10^9$ UFC por mililitro, mientras que Ganheim y col. (2005) utilizó dos inoculaciones, una de 10 ml de 5×10^7 UFC por mililitro y luego de 2 h una segunda inoculación de 15 ml de 5×10^8 UFC por mililitro. Esta mayor cantidad de ml y UFC podría haber producido una mayor liberación de corticoides endógenos, y como consecuencia, la referida linfopenia.

La fórmula leucocitaria se modificó a las 9 y 24 h PI (51 % de linfocitos/49 % de neutrófilos). Sin embargo, no se observó una inversión de la fórmula leucocitaria como sucede generalmente en infecciones agudas (Meyer y Harvey, 2000). Es de destacar que tanto previo a la infección (0 h) como en los muestreos posteriores a las 48 h y hasta las 120 h PI la fórmula se conservó dentro de los rangos de normalidad (70/30 % para linfocitos y neutrófilos respectivamente) (Kramer 2000).

Conclusión:

La infección experimental de terneros por *Mannheimia haemolytica*, bajo las condiciones del presente ensayo, causó variaciones en los parámetros hematológicos a las 9 y a las 24 h PI con neutrofilia y presencia de neutrófilos en banda y segmentados. Transcurridas las 48 h PI los parámetros hematológicos retornaron a valores normales pese a la presencia de signos clínicos de enfermedad en los animales infectados.

Bibliografía Citada

- Costa EF, Giuliodori MJ, Dezillio M, Romero JR. Mortalidad en un feedlot de La Plata (Buenos Aires, Argentina): causas, distribución mensual e impacto económico. *Analecta Vet* 2003; 23: 13-19.
- Cusack, PM, Mc Meniman, N, Lean, IJ. 2003. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J.* 81 (8), 480-487.
- Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 2007; 8:129-150.
- Doherty ML, Healy AM, Sherlock M, Cromie L, Mc Elvogue G. Combined oxitetracycline-flunixin therapy in field cases of acute bovine respiratory disease. *Irish Veterinary Journal* 2001, Vol 54 (5) 232-238.
- Fazzio LE, Landoni MF. Comparación de la eficacia de oxitetraciclina y tilmicosina en el tratamiento metafiláctico de la enfermedad respiratoria bovina en animales de feedlot. *Analecta Veterinaria* 2010, Volumen 30, 35-40- Número 02.
- Fazzio, LE, Giuliodori, MJ, Galván, WR, Streitenberger, N, Landoni, MF. A metaphylactic treatment with double dose oxytetracycline reduces the risk of bovine respiratory disease in feedlot calves. *Rev Vet* 2015, 26 (2): 89-92.
- Galvan WR, Yacachury N, Streitenberger N, Quiroga MA, Fazzio LE. Lesiones anatomopatológicas de bovinos en engorde a corral de un establecimiento de la provincia de Buenos Aires. 2014. *Revista n° 58 del CVPBA* 54-59.
- Ganheim C, Hulten C, Carlsson U, Kindahl H, Niskanen R and Waller K. The acute Phase Response in Calves Experimentally Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *J. Vet. Med. B* 50, 183–190 (2003) Blackwell Verlag, Berlin
- Ganheim C, Johannisson A, Ohagen AP and Persson WK. Changes in Peripheral Blood Leucocyte Counts and Subpopulations after Experimental Infection with BVDV and/or *Mannheimia haemolytica*. *Journal Compilation.* 2005. Blackwell Verlag, Berlin. *Journal of American Veterinary Medical B* 52, 380–385, 2005.
- Hanzlicek, G. A., White, B. J., Mosier, D., Renter, D. G., & Anderson, D. E. (2010). *Serial evaluation of physiologic, pathological, and behavioral changes related to disease progression of experimentally induced Mannheimia haemolyticapneumonia in postweaned calves. American Journal of Veterinary Research, 71(3), 359–369. doi:10.2460/ajvr.71.3.359.*

- Irwin MR, McConnell S, Coleman JD, Wilcox GE. Bovine respiratory disease complex: a comparison of potential predisposing and etiologic factors in Australia and the United States. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1979, 175: 1095–1099.
- Ióvne E, Selva A. *El Laboratorio en la Clínica. Metodología Analítica. Fisiopatología e Interpretación Semiológica*. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. 1985. Buenos Aires Argentina. p: 11-16.
- Johnson EG. Feedlot management practices and bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1985 Jul; 1(2):413-8.
- Keita A, Pommier P, Pagot E, Couper A, Cromie L. A combination oxytetracycline /flunixin treatment of respiratory infections in cattle. *Revue Méd. Vét*. 2007, 158, 02, 86-91.
- Kramer Jhon W. Normal hematology of cattle, sheep, and goats. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5 Edition. Editorial Lippincott Williams &Wilkins, 2000. P. 1075-78.
- Kelly AP, Janzen ED. A review of morbidity and mortality rates and disease occurrence in North America feedlot cattle. *Can. Vet. J* 1986. 27: 496-500.
- Love WL, Lehenbauer TW, Van Eenennaam AL, Drake CM, Kass PH, Farver TB, Aly SS. Sensitivity and specificity of on-farm scoring systems and nasal culture to detect bovine respiratory disease complex in preweaned dairy calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2016.
- Leonie Roland, Marc Drillich, Michael Iwersen, Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2014. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 26(5) 592–598, 2014.
- Meyer DJ, Harvey JW. *El laboratorio en medicina veterinaria, interpretación y diagnóstico*. 2º Edición. Editorial Intermédica. 2000. P. 100-110.
- Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews* 2007; 8(2); 117–128.
- Mike A. Breider, Robert D. Walker, Fred M. Hopkins, T. Wayne Schultz and Terry L. Bowersock. Pulmonary Lesions Induced by *Pasteurella haemolytica* in Neutrophil Sufficient and Neutrophil Deficient Calves. Michigan (Walker). 1987.

- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª Edición. Ed. Mc Grow- Hill. 2002; pp 514-547.
- Roth JA, Kaeberle ML, Griffith RW. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function. Am J Vet Res 1981; 42: 244 -250.
- Schunicht OC, Booker CW, Guichon PT, Jim GK, Wildman BK, Pittman TJ, Perrett T. An evaluation of the relative efficacy of tulathromycin for the treatment of undifferentiated fever in feedlot calves in Nebraska. Can Vet J 2007; 48(6): 600-606.
- Singh K, Ritchey JW, and Confer AW. *Mannheimia haemolytica*: Bacterial–Host Interactions in Bovine Pneumonia. 2011. Veterinary Pathology 48(2) 338-348 ^a the American College of Veterinary Pathologists 2011.
- Taylor Judith A. Leukocyte Responses in Ruminants. Schalm's Veterinary Hematology. 5 Edition. Editorial Lippincott Williams & Wilkins, 2000. P. 394.
- Thompson P, Stone A, Schultheiss W. Use of treatment records and lung lesion scoring to estimate the effect of respiratory disease on growth during early and late finishing periods in South African feedlot cattle. J Anim Sci 2006; 84:488-498.
- Valli VEO, Kiupel M, Bienzle D, Wood D. (2016). Hematopoietic System. En: Maxie MG (editor) Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Vol. 3 (pp. 102-268). Edinburgh, UK: Elsevier Ltd.
- Zabolotzky SM. and Walker DB, 2014. Peripheral Blood Smears. Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology of the dog and cat, 4ª edición Copyright © 2014 by Mosby, Inc., an imprint of Elsevier Inc. Pag. 477-483.