

225  
24



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

EVALUACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA DIFERENTES INMUNOGENOS DE Pasteurella haemolytica EN CORDEROS DE MADRES INMUNIZADAS EN TERCER TERCIO DE LA GESTACION.

T E S I S  
Que para obtener el Título de  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
p r e s e n t a  
MARIA CLAUDIA SUAREZ MEDINA



Asesores: Q.F.B. Laura Jaramillo M.  
M.V.Z. Rosa Berta Angulo M.  
M.V.Z. Francisco Suárez G.

México, D. F.

1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## C O N T E N I D O

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	13
RESULTADOS.....	20
DISCUSION.....	26
LITERATURA CITADA.....	29

RESUMEN

SUAREZ MEDINA MARIA CLAUDIA: "EVALUACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA DIFERENTES INMUNOGENOS DE Pasteurella haemolytica EN CORDEROS DE MADRES INMUNIZADAS EN TERCER TERCIO DE LA GESTACION." Asesores: Q.F.B. Laura Jaramillo Meza, M.V.Z. Rosa Berta Angulo Mejorada y M.V.Z. Francisco Suárez Gómez.

Con la finalidad de evaluar la respuesta inmune contra Pasteurella haemolytica A-1 conferida a corderos a través del calostro, en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (C.O.P.E.A.) se inmunizaron 60 borregas en último tercio de la gestación, lotificadas al azar en grupos de 10, con inmunógenos preparados con antígenos de la bacteria: leucotoxina, material capsular y bacteria viva. Se tomaron muestras sanguíneas de los corderos al nacer, previo al consumo de calostro, y después a las 24, 72 y 168 horas. Para titular los anticuerpos séricos contra leucotoxina se utilizó la prueba de ensayo visual simple, y para titular los anticuerpos contra material capsular se utilizó la técnica de hemaglutinación indirecta. Puesto que la bacteria viva produce leucotoxina y posee cápsula, también se utilizaron las pruebas anteriores para titular los anticuerpos contra ella. El análisis estadístico se realizó utilizando un procedimiento GLM del paquete estadístico SAS, con un diseño al azar con arreglo factorial anidado. En la prueba del ensayo visual simple no se observaron diferencias significativas, mientras que en la de hemaglutinación los grupos inmunizados con la leucotoxina probaron ser los que hablan conferido mayores títulos de anticuerpos contra material capsular a sus corderos, encontrándose el título más alto en el muestreo de las 24 horas. Se concluye que la inmunización de borregas gestantes con inmunógenos preparados con leucotoxina de Pasteurella haemolytica A-1 confiere títulos altos de anticuerpos séricos, mediante transferencia pasiva, a sus crías.

## INTRODUCCION.

La explotación ovina representa una importante actividad ganadera en la República Mexicana; sin embargo, se encuentra limitada por las diversas enfermedades que afectan a estos animales. Entre éstas los problemas neumónicos ocupan un lugar relevante, debido a que ocasionan pérdidas económicas considerables por tratamientos contra la enfermedad, mala conversión alimenticia que conlleva el retraso en el crecimiento de los animales afectados crónicamente y finalmente por los elevados índices de mortalidad causada en poblaciones jóvenes susceptibles (36,38,45).

Son numerosos los informes sobre prevalencias de neumonías en ovinos, tanto a nivel nacional como internacional, que ponen de manifiesto la relevancia de este tipo de enfermedades como una de las principales causas de mortalidad perinatal con índices que varían de acuerdo con la procedencia, tipo de explotación, edad de los animales y época estacional del año, con tasas promedio de prevalencia que van del 10 al 40% (25,26,31,33,42,44,45,55,56). Cabe entonces mencionar algunos de los reportes que ejemplifican el problema a nivel mundial:

Jensen y colaboradores efectuaron la necropsia de 133 corderos, encontrando que 67 presentaban pulmones normales y 66 pulmones con lesiones neumónicas. En estos últimos, la infección respiratoria ascendió hasta el canal auditivo medio (27).

En Irlanda del Norte se realizó un seguimiento de las enfermedades respiratorias en corderos de crianza intensiva, y los microorganismos más frecuentemente aislados fueron Pasteurella haemolytica y Mycoplasma ovipneumoniae (33).

En un estudio efectuado en 814 corderos que presentaron un brote epizootico de enfermedad respiratoria, de la mortalidad final el 57.6% se atribuyó a las neumonías. Se obtuvieron 19 muestras de pulmones de estos animales, y de 11 de ellas (58%) se aisló P. haemolytica. Los serotipos predominantes fueron: A-1, A-2, A-5, A-6 y A-12 (31).

Sultan y Aitken encontraron que en las tonsilas de corderos menores de 3 días de edad, el serotipo predominante es la P. haemolytica A-1 (52).

En México, Martínez y colaboradores realizaron un seguimiento bacteriológico en muestras de pulmones de corderos muertos por problemas neumónicos, los cuales provenían de diferentes explotaciones del Estado de México, encontrando que P. haemolytica fue aislada en el 34.7% de los casos (35).

Un estudio de serotipificación de aislamientos de P. haemolytica obtenidos de pulmones neumónicos de ovinos procedentes de la zona centro del país muestra que los serotipos capsulares predominantes son: A-1, A-2, A-5 y A-9 (8).

#### CARACTERISTICAS GENERALES DE Pasteurella haemolytica

P. haemolytica es un cocobacilo pleomórfico, Gram negativo, inmóvil, capsulado, con un metabolismo fermentativo, oxidasa y catalasa positivo.

P. haemolytica forma estrechas zonas de beta hemólisis, la cual muchas veces no es visible sino hasta que se levanta la colonia con el asa bacteriológica (5).

Se distinguen dos biotipos de P. haemolytica con base en sus reacciones de fermentación ante los azúcares arabinosa y trehalosa, designándose como :

biotipo A- a las cepas que fermentan la arabinosa, y como

biotipo T- a las cepas que fermentan la trehalosa (22).

Craft y colaboradores desarrollaron un método para distinguir a estos dos biotipos utilizando lectinas vegetales. Encontraron que el biotipo T de P. haemolytica es aglutinado por la lectina del germen de trigo (Triticum vulgare) mientras que el biotipo A no presenta esta reacción (14).

Además existen variaciones en cuanto a morfología colonial y patrones de resistencia a antibióticos dentro de estos biotipos (19).

Se han diferenciado en la actualidad 15 serotipos capsulares de P. haemolytica; la sustancia capsular bacteriana de naturaleza polisacárida es responsable de la especificidad serológica y se ha presupuesto que puede jugar un papel importante en la patogenicidad de la bacteria (19).

Este material capsular puede adherirse fácilmente a eritrocitos de bovino, lo cual permite que la prueba de hemaglutinación indirecta sea ampliamente usada para estudios de serotipificación (5).

Dentro del biotipo A de P. haemolytica se encuentran los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 mientras que para el biotipo T se han determinado los serotipos 3, 4 y 10 (22).

Los organismos de P. haemolytica son agentes causales de 2 diferentes enfermedades clínicas en borregos y corderos. Los serotipos A se han encontrado predominantemente asociados con neumonías y septicemia en corderos, y los serotipos T causan la pasterelosis septicémica en animales adultos (4,22).

#### FACTORES DE VIRULENCIA Y MECANISMO DE ACCION.

P. haemolytica presenta diversos factores asociados con su virulencia. Por ejemplo, produce una exotoxina que ha demostrado ser citotóxica para macrófagos alveolares, monocitos, neutrófilos, polimorfonucleares y linfocitos de rumiantes (3,29,34,37); además, inhibe la producción de factores quimiotácticos de los polimorfonucleares por parte de los macrófagos. Estas células fagocíticas se consideran como la primera línea de defensa a nivel pulmonar contra el establecimiento y desarrollo de infecciones respiratorias (58). La muerte de estas células fagocíticas por la leucotoxina de P. haemolytica resulta en la disminución del número de células disponibles para la defensa del huésped,



y en la liberación de enzimas proteolíticas, metabolitos del ácido araquidónico, histamina, prostaglandina y otros mediadores químicos del proceso inflamatorio que contribuyen al daño pulmonar (29,34,35). Por ello se ha considerado la leucotoxina de P. haemolytica como el principal factor de virulencia de la bacteria. Se ha demostrado que esta citotoxina es producida por todos los serotipos de P. haemolytica durante la fase temprana logarítmica de crecimiento, alcanzando su máxima producción a las 6 horas; y disminuye durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano (2,49).

La toxina tiene un componente polipeptídico como principal componente proteínico, en él reside la actividad tóxica; misma que es neutralizada por los antisueros dirigidos contra este polipéptido, y es sensible a la degradación enzimática con la consecuente pérdida de actividad (7,16).

Otro factor de virulencia es la endotoxina, un complejo fosfolípido polisacárido proteínico, que constituye del 12 a 25% del peso seco de la bacteria. Sus efectos o propiedades son similares a las de las endotoxinas de otras bacterias Gram negativas. Esta endotoxina ha sido evaluada por su efecto dermatóxico en conejos, y su efecto hemodinámico en borregos (30), ya que es capaz de inducir hipotensión con colapso circulatorio, fiebre, necrosis dérmica (reacción de Shwartzman localizada), coagulación intravascular diseminada (reacción de Shwartzman generalizada), trombopenia y

leucocitosis o leucopenia (30,48). Los mecanismos por medio de los cuales las endotoxinas ejercen su acción es activando mediadores químicos de los procesos de la inflamación y de la coagulación, así como del sistema del complemento (40). La endotoxina o lipopolisacárido de P. haemolytica genera y libera un factor quimiotáctico para los neutrófilos, los cuales se acumulan en los alveolos pulmonares para eliminar a la bacteria. Sin embargo, si la proporción bacteria:neutrófilo es de 100:1, únicamente logran fagocitar el 31% de las bacterias, y el resto de los neutrófilos se ve dañado por la toxina producida por las bacterias. Se liberan las enzimas proteolíticas iniciándose la inflamación y daño en el tejido pulmonar (3, 34).

Ciertas estructuras localizadas en la superficie, como glicocálix y fimbria, también se consideran factores de virulencia. En un estudio cuyo propósito era determinar estas estructuras en P. haemolytica A-1, se reconocieron glicocálix y fimbria rígida. Esta última se encontró presente en cultivos mantenidos en condiciones de agitación tanto como en aquellos mantenidos en estática, pero el glicocálix no se identificó en los cultivos mantenidos en agitación (37).

Se utilizaron técnicas rutinarias de fijación y de tinción negativa, y mediante la tinción con rojo ruténico se identificó gran cantidad de glicocálix en bacterias en fase logarítmica de crecimiento, y se piensa que es importante

para la sobrevivencia de la bacteria in vivo (37).

No se conoce detalladamente el papel de estas estructuras, aunque se considera que inician y mantienen la colonización bacteriana. La fimbria es el primer factor que permite la fijación de la bacteria a las células epiteliales de la mucosa nasofaríngea, mientras que el glicocálix defiende a la bacteria contra la fagocitosis, permitiendo que se multiplique y produzca leucotoxina (37).

#### ANTECEDENTES

La neumonía causada por esta bacteria se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa de curso agudo o sobreagudo que puede manifestarse como septicemia en animales jóvenes (4).

P. haemolytica coloniza normalmente el aparato respiratorio alto de los rumiantes, pero puede, bajo ciertas condiciones que inmunodeprimen las defensas del huésped, tales como la primoinfección por virus o altas concentraciones de cortisol, afectar la función de los macrófagos, lo cual permite el establecimiento y daño al tejido pulmonar por la bacteria (9,17,18,34,57).

Otros factores juegan un papel determinante en el desarrollo de la enfermedad, como son: temperatura baja, humedad alta y ventilación deficiente (28).

Debido al fuerte impacto económico consecuente de la prevalencia de la pasterelosis en los animales, se han

buscado diferentes formas que permitan el control y, por supuesto, la prevención de la enfermedad.

El uso de bacterinas como medida preventiva se va desechando día con día debido a evidencias clínicas que muestran que los animales bacterinizados desarrollan neumonías más severas que los no bacterinizados, confirmado esto por las lesiones encontradas en los pulmones durante la necropsia (10,51). Ello se explica por el hecho de que este tipo de inmunógenos inducen una respuesta dirigida contra los antígenos de superficie de la bacteria formando opsoninas que facilitan la fagocitosis de la bacteria por el macrófago alveolar, el cual se muere por el efecto tóxico que no fue neutralizado al no producirse anticuerpos anticitotóxica con la aplicación de la bacterina. Con la muerte del macrófago, se liberan enzimas proteolíticas y mediadores que dañan el tejido pulmonar (10,20).

En la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de inmunógenos para la prevención de la pastereiosis pulmonar, poniendo en juego variables como la ruta de inmunización, uso de adyuvantes y concentración. Los inmunógenos de P. haemolytica que se han probado con resultados aparentemente satisfactorios en algunos casos son: la bacteria viva en fase de crecimiento logarítmico, leucotoxina, extractos solubles obtenidos por extracción con salicilato de sodio o tiocianato de potasio y el lipopolisacárido tipo específico (11,15,16,50).

Por ejemplo, en la evaluación de 3 bacterinas comerciales y una vacuna experimental para prevenir la pastereiosis en cabras se demostró que utilizando la vacuna con microorganismos vivos se obtenía mejor resultado que con las bacterinas inactivadas (6).

Trigo y Romero estudiaron la incidencia de neumonías en corderos del Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (C.O.P.E.A.) de 1983 a 1985, encontrando que ésta fue del 28% y que la mayoría de las muertes por esta causa ocurrían antes de los 2 meses de edad. Estos autores sugieren que la transferencia de inmunidad pasiva por medio del calostro y otros aspectos de manejo en los corderos neonatos deben observarse y corregirse en este hato (55).

Con este fin en 1984 se inmunizaron borregas gestantes del C.O.P.E.A., aplicando parenteralmente una bacteria doble contra P. haemolytica y P. multocida en estos animales. Se observó un incremento significativo en los títulos de anticuerpos séricos contra la bacteria, por lo que se infirió de manera indirecta que los corderos quedarían protegidos contra la pastereiosis pulmonar al mamar el calostro materno rico en anticuerpos específicos (1). Posteriormente, en 1986, se evaluaron los títulos de anticuerpos presentes en el calostro de borregas bacterinizadas a los 90, 105 y 115 días de gestación (43). Los resultados de diversas investigaciones señalan que la vacunación de las hembras gestantes con un inmunógeno

adecuado confiere al cordero protección contra la pastereelosis (13).

Se ha comprobado que de la inmunización sistémica se obtiene la presencia de anticuerpos en la glándula mamaria. El sistema inmune de ésta tiene dos funciones: proteger a la glándula en sí y proveer inmunidad al neonato, sobre todo a través del calostro, rico en IgG (41,54).

Es importante que el cordero tome calostro, porque la placentación sindesmocorial de los rumiantes no permite la transferencia de anticuerpos a través de placenta (24,54).

En las crías recién nacidas existe poca actividad proteolítica en el intestino, por lo que las partículas contenidas en el calostro no se desdoblán y llegan sin alteración al ileon, donde se absorben activamente por las células epiteliales mediante pinocitosis. Atraviesan estas células hasta llegar a los vasos quilíferos y capilares, y así alcanzan la circulación general (39,54).

En corderos, las inmunoglobulinas maternas adquiridas por medio del calostro son transferidas selectivamente, por mecanismos poco conocidos hasta ahora, a las mucosas del aparato respiratorio, donde contribuyen a la protección del daño pulmonar por patógenos específicos (57).

## HIPOTESIS

Los grupos de borregas inmunizados con la leucotoxina y los grupos a los que se les aplique la bacteria viva serán los que confieran a sus corderos una mayor inmunidad pasiva contra P. haemolytica.

## OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar los títulos de anticuerpos séricos, adquiridos a través del calostro, en los corderos de madres a las cuales se les aplicaron diferentes inmunógenos preparados con antígenos de P. haemolytica.

## MATERIAL Y METODOS.

El experimento se realizó en el C.O.P.E.A. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en la desviación a Topilejo de la carretera federal a Cuernavaca (km 28.5). Geográficamente se localiza a 19° 13' latitud norte y 99° 8' de longitud oeste, a 2760 msnm (1). El sistema de producción del Centro es intensivo con estabulación total. Se escogieron 60 borregas (cruzas de diversas razas) en tercer tercio de la gestación, y al azar se lotificaron en 6 grupos de 10 animales cada uno. La dieta de éstos consistió en: 1.5 kg de ensilado de rye grass, 300 gr de sorgo, 1.5 kg de heno de avena, con agua y sales minerales ad libitum.

### Inmunización.

Los inmunógenos utilizados fueron 3:

- 1) P. haemolytica en fase logarítmica de crecimiento a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml.
- 2) Extracto capsular obtenido por extracción con salicilato de sodio, lo que se hizo de la siguiente manera: después de que la bacteria fue cultivada durante 18 horas en infusión caldo cerebro corazón, se depositaron 5 ml de este inóculo en 3 volúmenes de 50 ml de infusión caldo cerebro corazón. Se incubaron 6 horas a 37 C en agitación continua, y se centrifugaron a  $12000 \times g$  a 4 C. Se resuspendió en 50 ml de salicilato de sodio 1 M, y esta mezcla se incubó 3 horas a



37 C, para después centrifugarse a 28000 x g a 4 C, y concentrarse mediante liofilización (16).

3) Leucotoxina. Para obtenerla, se siguió este procedimiento: Se sembró P. haemolytica A-1 en medio agar sangre y se cultivó 18 horas a 37 C. Pasado este tiempo, se inoculó en un matraz con RPMI-1640\* para incubarse a 37 C durante 5 horas en baño maría con agitación constante.

Se considera que después de las 5 horas la bacteria se encuentra en fase de crecimiento logarítmico. En ese momento, se centrifugó el cultivo a 60000 x g\*\* durante 30 minutos, y posteriormente el sobrenadante se esterilizó por filtración utilizando membranas de nitrocelulosa\*\*\* desde 1.2Mm hasta .22Mm.

Para evaluar la actividad citotóxica de la leucotoxina se utilizó el método de ensayo visual simple(21), y también se determinó su contenido proteínico por el método de Lowry (32).

Los inmunógenos fueron desarrollados a partir de P. haemolytica A-1 en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias-Sria. de Agricultura y Recursos Hidráulicos (CENID, INIFAP-SARH).

\*Roswell Park Memorial Institute 1640; Lab. In Vitro, Mex.  
\*\*en una centrifuga con unidad refrigerante Beckman modelo J-6B.  
\*\*\*Millipore Corporation.

Los inmunógenos se aplicaron según el siguiente esquema (46):

Grupo 1: control

Grupo 2: leucotoxina

Grupo 3: leucotoxina más adyuvante incompleto de Freund.

Grupo 4: extracto capsular soluble más adyuvante incompleto de Freund más leucotoxina

Grupo 5: extracto capsular soluble más adyuvante incompleto de Freund.

Grupo 6: bacteria viva  $1 \times 10^9$  UFC/ml.

La vía de administración para todos los grupos de borregas gestantes fue subcutánea. Cuando se presentó el parto, se obtuvo suero sanguíneo del cordero neonato (mediante punción en la yugular, con agujas y tubos vacutainer sin anticoagulante) antes de que consumiera calostro, y después, a las 24, 72 y 168 hrs., ya que hubo consumido calostro.

#### Pruebas serológicas

Se utilizó la prueba de hemaglutinación indirecta, que consiste en lo siguiente:

Obtención de los eritrocitos.- Se puncionó con aguja estéril la vena yugular de un bovino, y la sangre se recogió mediante una manguera conectada a un matraz kitazato sellado con tapón de hule (todo este material también estéril). El matraz contenía perlas de vidrio para desfibrinar la sangre con los movimientos circulares provocados al agitar el matraz. La sangre se almacenó por lo menos 7 días. Pasado

este tiempo se le agregó solución salina fisiológica y se centrifugó a  $560 \times g^*$  durante 10 minutos. El procedimiento se repitió hasta obtener un sobrenadante completamente claro, mismo que se decantó y el paquete de glóbulos rojos se sensibilizó con el antígeno (5).

Procedimiento para sensibilizar glóbulos rojos con el antígeno capsular de P. haemolytica.- Se colocaron en un frasco 50 ml de caldo de infusión cerebro corazón con P. haemolytica A-1. Se incubó a 37 C durante 18 horas en baño maría con agitación continua.

Posteriormente, se inactivó el cultivo elevando a 56 C la temperatura, durante 30 minutos. Con este calentamiento se favorece la liberación de antígenos capsulares solubles (23). Una vez que el cultivo descendió a los 35 C +/-, se le agregó 0.5 ml del paquete de eritrocitos de bovino, y se repitió la incubación a 37 C en baño maría por una hora más. Después, se centrifugó a  $1200 \times g^*$  durante 10 minutos.

Se procedió a decantar el sobrenadante para repetir la operación. Finalmente, los eritrocitos sensibilizados se resuspendieron en un volumen de 100 ml en PBS (pH 7.2, 0.15M de NaCl y 0.01M de  $PO_4$ ) quedando así una suspensión de 0.5% de eritrocitos sensibilizados (5, 18).

\*utilizando una centrifuga Optima II modelo BHG 720

Desarrollo de la prueba.- Para inactivar el complemento, los sueros se calentaron a 56 C durante 30 minutos, posteriormente se hicieron diluciones 1:2 con PBS. Se utilizaron placas para microtitulación de 96 pozos con fondo "U" y a cada pozo se le vertieron 0.025 ml de diluyente PBS. A los pozos de la hilera A de cada placa, se les colocaron 0.25 ml de cada uno de los sueros de prueba inactivados y diluidos 1:2. Utilizando un microdilutor, se hicieron diluciones hasta 1:512. A cada pozo se le añadió una gota (0.025 ml) de eritrocitos sensibilizados. Pasadas 24 horas, se observó cada placa para determinar hasta que dilución se habían hemaglutinado las células en el fondo del pozo, y así se titularon los anticuerpos contra antígenos capsulares. También se realizó el ensayo visual simple, que consiste en lo siguiente:

Preparación de los leucocitos.- Utilizando agujas y tubos vacutainer con heparina, se puncionó la yugular de un bovino para obtener sangre periférica y de ésta, los leucocitos, por lisis hipotónica de los eritrocitos, de la siguiente manera: se agregó a la sangre un volumen igual de agua destilada, y pasados 30 segundos se añadió el mismo volumen de PBS concentrado (2X). Se centrifugó después a 336 x g\* durante 20 minutos.

\*en una centrifuga Dynae Clay Adams, Becton & Co., NJ.

Después de resuspender los leucocitos en RPMI-1640\* se repitió la operación. Finalmente, la concentración de leucocitos quedó ajustada a  $10^5$  cels./ml.

Para obtener la citotoxina, se utilizó el método descrito en la preparación de los antígenos (21,32).

Desarrollo de la prueba.- Se realizó en placas para microtitulación de 96 pozos con fondo plano. Los sueros se inactivaron en baño maría a 56 C durante 30 minutos, y se hicieron diluciones 1:2 con PBS .

En las placas se vertieron 0.050ml de PBS en cada pozo. A los de la fila A se les agregó 0.050 ml de los sueros de prueba, y posteriormente se hicieron diluciones dobles con un microdilutor. Hecho esto, se añadieron 100 ml de citotoxina, y se incubaron las placas 10 minutos a temperatura ambiente, para después colocar 100 microlitros de la suspensión de leucocitos previamente estandarizada en cada uno de los pozos.

Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 C, y posteriormente se centrifugaron 10 minutos a  $582 \times g^{**}$ . El sobrenadante se decantó por inversión rápida de la placa y para fijar los leucocitos se vertieron 100 microlitros de formalina al 10% en cada pozo. Pasados 10 minutos a temperatura ambiente, se colocó en los pozos cristal violeta al 1%, que se dejó durante 5 minutos.

\*Roswell Park Memorial Institute-1640; Lab. In Vitro, Mex.  
\*\*en una centrifuga con unidad refrigerante Beckman modelo J-6B.

Después, se lavaron las placas con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Un fondo azul indicó la presencia de leucocitos que absorbieron el cristal violeta, manifestando la presencia de anticuerpos que impidieron que la citotoxina los destruyera. Un fondo transparente señaló la destrucción de los leucocitos, debido a la ausencia de anticuerpos neutralizantes de la actividad citotóxica.

Para titular los anticuerpos específicos contra citotoxina y cápsula se utilizaron la técnica de ensayo visual simple (21) y la prueba de hemaglutinación indirecta (5), respectivamente.

#### Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el procedimiento GLM, del paquete estadístico SAS (BARR, 1990) con un diseño completamente al azar con arreglo factorial anidado, siguiendo el modelo (47):

$$y_{ijkl} = \mu + \tau_i + A\alpha_j + \tau_k + \tau_{ik} + e_{ijkl}$$

$y_{ijkl}$  = Observación de anticuerpos determinados por HA o EVS en el  $i$ -ésimo tratamiento, del  $j$ -ésimo animal y la  $n$ -ésima hora del muestreo.

$\mu$  = media poblacional

$\tau_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$A\alpha_j$  = efecto del  $j$ -ésimo animal anidado dentro del  $i$ -ésimo tratamiento

$\tau_k$  = efecto de la  $k$ -ésima hora de muestreo

$\tau_{ik}$  = efecto de la interacción del  $i$ -ésimo tratamiento con la  $k$ -ésima hora de muestreo.

$e_{ijkl}$  = error aleatorio NID  $(0, \sigma^2)$

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la prueba de Hemaglutinación Indirecta para determinar anticuerpos contra la superficie celular de P. haemolytica se muestran en el cuadro 1, donde los títulos promedio para los diferentes tratamientos y horas de muestreo se expresan en logaritmo base 2. El análisis estadístico efectuado mostró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para las diferentes horas de muestreo de todos los tratamientos, observándose, en la Gráfica 1, el mayor nivel de anticuerpos anticápsula a las 24 horas después del nacimiento, mismo que tendió a disminuir después de este momento, permaneciendo en niveles detectables aún a las 168 horas (7 días).

En la misma gráfica se representa el comportamiento de cada uno de los grupos con los diferentes tratamientos de acuerdo con el análisis estadístico y se observa que el grupo testigo (T1) presenta los niveles de anticuerpos más bajos para esta prueba, y que su comportamiento en los diferentes muestreos es similar al de los grupos T5 y T6.

Los grupos T2, T3 y T4 presentaron los niveles de anticuerpos más altos en esta prueba ( $P < 0.01$ ). Los animales pertenecientes a estos últimos grupos provienen de madres inmunizadas con citotoxina (T2), citotoxina más adyuvante (T3), y citotoxina más adyuvante más ESC (T4) y su comportamiento fue similar. Los grupos T2 y T4 difieren del

T5 ( $P < 0.01$ ). El grupo T2 (citotoxina sola) presentó los niveles más elevados de todos los tratamientos a las 24 horas. Sin embargo, el grupo T4 (citotoxina más adyuvante más ESC) fue el que mantuvo sus niveles más altos a las 168 horas.

Sin tomar en cuenta el grupo testigo, que presentó los títulos más bajos de todos los grupos, se puede considerar que los corderos provenientes de madres inmunizadas con ESC y con la bacteria viva dieron los títulos más bajos.

La gráfica 2 representa el valor promedio de los diferentes grupos de corderos en los diferentes tiempos de muestreo con sus límites máximos y mínimos, en donde se observa que los límites inferiores son superiores a los valores del grupo testigo, indicando que sí existió un efecto consecuente de los tratamientos sobre la inmunidad pasiva de los corderos a P. haemolytica.

Los valores promedio obtenidos en la prueba de seroneutralización de citotoxina de P. haemolytica por medio de la técnica de Ensayo Visual Simple se muestran en el cuadro 2 y también se expresan en logaritmo base 2. Se observa que hubo diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) para las diferentes horas del muestreo en todos los grupos. Sin embargo no existió diferencia estadística entre los tratamientos.

En la gráfica 3 se representan las curvas de anticuerpos anticitotoxina para los diferentes grupos, en donde se puede



observar que el grupo testigo (T1) presentó los niveles de anticuerpos neutralizantes más bajos, y fue el grupo de corderos de madres inmunizadas con citotoxina más adyuvante (T3) el que presentó los títulos de anticuerpos neutralizantes más altos, seguido del grupo (T4) de crías de madres inoculadas con citotoxina más ESC más adyuvante.

Los corderos de madres inmunizadas con la bacteria viva presentaron los niveles de anticuerpos neutralizantes más bajos, muy similares al grupo testigo.

En la Gráfica 4 se representan los valores promedio de anticuerpos neutralizantes de todos los tratamientos con sus límites máximos y mínimos. Se puede observar que los valores de los límites mínimos son mayores que los obtenidos para el grupo testigo después de las 24 horas.

Cuadro 1.

Log 2 de las diluciones (títulos) de anticuerpos determinados usando la técnica de Hemaglutinación.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	X
H0	0.78	1.13	0.33	0.50	0.33	0	0.51+/- .18a
H24	2.69	4.75	4.00	4.38	3.00	3.17	3.66+/- .17b
H72	2.44	4.25	3.75	3.88	3.00	3.40	3.45+/- .18b
H168	2.13	2.80	3.25	3.88	2.00	2.83	2.81+/- .18c
	T1	T2	T3	T4			
X	2.01+/- .18d	3.23+/- .19e	2.83+/- .28ef	3.16+/- .19e			
	T5	T6					
X	2.08+/- .22d	2.35 +/- .22df					

a,b,c. Distintas literales en la columna son estadísticamente diferentes  $P < 0.05$ .  
 d,e,f. Distintas literales en el renglón son estadísticamente diferentes  $P < 0.01$ .

Cuadro 2

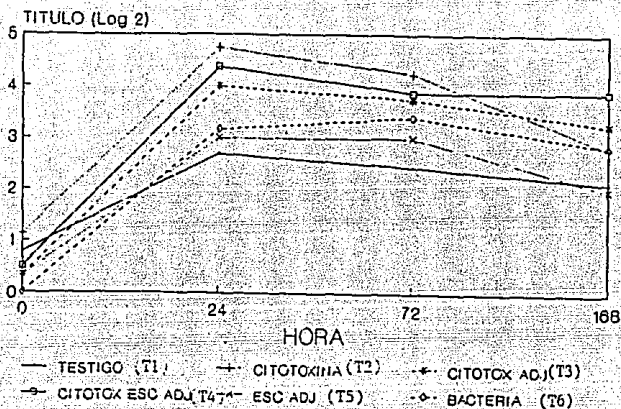
Log 2 de las diluciones (títulos) de anticuerpos determinados con la técnica de Ensayo Visual Simple.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	X
H0	2.22	1.38	3.00	0.25	0.33	0	1.20+/- .22a
H24	5.04	5.50	6.75	5.63	5.17	5.50	5.60+/- .23b
H72	4.38	5.25	7.25	5.75	5.67	7.73	5.50+/- .24b
	T1	T2	T3	T4			
X	3.90+/- .29	4.10+/- .25	5.68+/- .35	4.18+/- .26			
	T5	T6					
X	4.08+/- .29	3.68+/- .30					

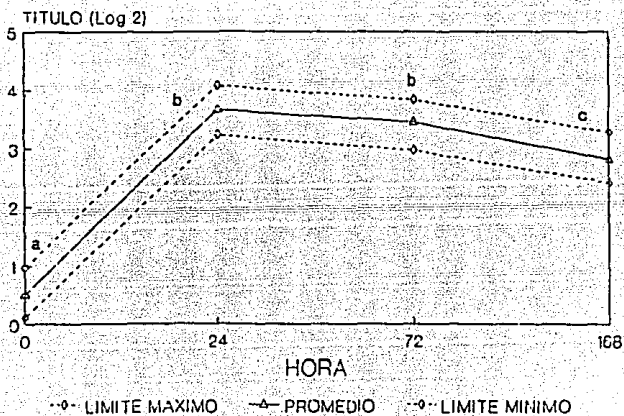
a,b. Distintas literales en la columna son estadísticamente diferentes ( $P < 0.01$ ).

- T1= grupo testigo
- T2= leucotoxina
- T3= leucotoxina más adyuvante incompleto de Freund
- T4= leucotoxina más ESC más adyuvante incompleto de Freund
- T5= ESC más adyuvante
- T6= bacteria viva

## HEMAGLUTINACION

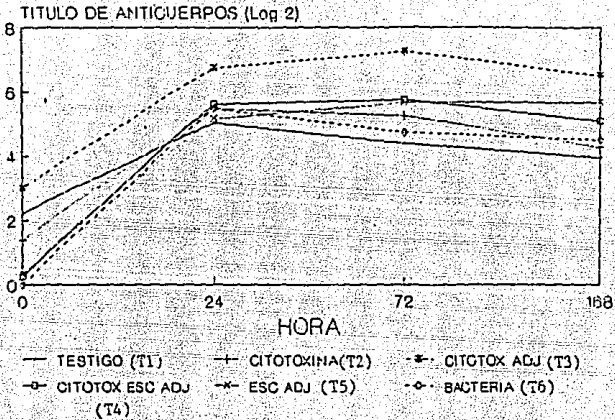


GRAFICA 1.-Comportamiento de los diferentes grupos en todas las horas de muestreo.

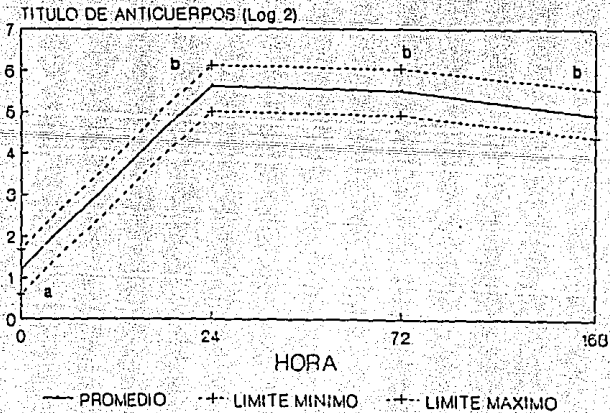


GRAFICA 2.-Promedio de los tratamientos con su límite máximo y su límite mínimo.

ENSAYO VISUAL SIMPLE



GRAFICA 3.- Comportamiento de los diferentes grupos en todas las horas de muestreo.



GRAFICA 4.- Promedio de los tratamientos con su límite máximo y su límite mínimo.

DISCUSION.-

A través del análisis estadístico de los resultados del presente trabajo, se logró establecer diferencia estadísticamente significativa en la prueba de hemaglutinación, siendo el grupo de madres inmunizadas con leucotoxina sola (T2) el que logró un mayor título de anticuerpos anticápsula en el suero de sus corderos.

Shewen y Wilkie encontraron que la inmunización de becerros con citotoxina lograba estimular a los anticuerpos aglutinantes de la bacteria, además de producir también una mejor respuesta anticitotóxica (51).

Por otro lado, Sutherland y colaboradores probaron 3 diferentes inmunógenos contra la bacteria; y encontraron que una preparación de citotoxina combinada con extracto obtenido con salicilato de sodio daba una protección del 98% y la citotoxina sola protegía en 86% a los animales inmunizados. El ESC solo, a su vez, dio solamente una protección del 47% en los animales desafiados. En ese trabajo, se estableció una correlación entre la protección y títulos neutralizantes contra citotoxina y actividad bactericida, estimulados ambos por antígenos contenidos en la preparación de citotoxina (53).

En el presente estudio, no se estableció diferencia estadísticamente significativa para los diferentes grupos en la titulación de anticuerpos anticitotoxina mediante el ensayo visual simple, pero esto difiere de los resultados

obtenidos en otros trabajos. Por ejemplo, en el estudio de los sueros de 40 becerros sometidos a diferentes tratamientos, en el que hubo una mayor respuesta al desafío experimental en los animales inmunizados con bacteria viva que en los vacunados con PBS o bacterinas comerciales (21).

Existe otro experimento en que se utilizaron como inmunógenos bacterias vivas liofilizadas y reconstituidas, y bacterias de cultivos recientemente cosechados, y los animales resistieron al desafío experimental, mientras que los del grupo testigo murieron a las 24 horas (12).

Hay autores que afirman que la presencia de anticuerpos anticitotoxina serán la clave para la resistencia del animal ante la enfermedad, y que por ello los inmunógenos deben constar de bacteria viva o bien de leucotoxina más antígenos de superficie y adyuvante incompleto de Freund (6,12).

Es importante mencionar que los resultados que se obtuvieron en este trabajo pueden haber sido modificados a causa de innumerables factores. Uno de ellos es el hecho de que el constante manejo produce en los animales un fuerte estrés que afecta la respuesta inmune (9). Otro factor es el que desafortunadamente en algunos de los grupos de borregas el diagnóstico de gestación no fue acertado, lo que resultó en diferente número de corderos en cada uno de los grupos. Existe también la posibilidad de que alguno de los corderos haya consumido calostro antes de su primer muestreo, y eso haya resultado en una alteración en los títulos, como en los

resultados de la detección de anticuerpos anticitotoxina mediante ensayo visual simple en algunos animales de los grupos T1 y T2.

Se concluye que la aplicación de inmunógenos preparados con la leucotoxina de Pasteurella haemolytica A-1 a borregas en tercer tercio de la gestación eleva los anticuerpos séricos contra antígenos capsulares de la bacteria en sus corderos, siempre y cuando consuman calostro, y que el uso de adyuvantes puede ser beneficioso cuando se utiliza la citotoxina como inmunógeno, ya que ayuda a mantener los títulos de anticuerpos neutralizantes; aunque para hablar de niveles de protección es necesario efectuar el desafío experimental de los animales.

LITERATURA CITADA.

- 1.- Alba, G.G.: Evaluación de la respuesta inmunológica en ovinos bacterinizados contra Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1984.
- 2.- Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Bemrick, N.J., Maheswaran, S.K.: Interaction of Pasteurella haemolytica with Bovine Neutrophils: Identification and partial Characterization of a cytotoxin. Am.J.Vet. Res. 42: 1920-1926 (1981).
- 3.- Berggren, K.A., Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Bemrick, N.J., Maheswaran, S.K.: Cytotoxic effects of Pasteurella haemolytica on Bovine Neutrophils. Am.J.Vet.Res. 42 (8): 1383-1388 (1981).
- 4.- Blood, D.C., Henderson, J.A. y Rodostits, O.M.: Medicina Veterinaria. 5ta edición, Ed. Interamericana México, D.F., 1983.
- 5.- Biberstein, E.L.: Biotyping and Serotyping of Pasteurella haemolytica. In: Methods in Microbiology. Berges, T. and Norris, J.R. 10: 253-269 (1978).
- 6.- Castro Romero, Z.G.: Evaluación de tres bacterinas inactivadas y una vacuna experimental contra la pasteurellosis neumónica encabras. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1988.
- 7.- Chang, Y.F., Post, D., Struck, D.K.: Identification and characterization of the Pasteurella haemolytica leucotoxin. Infect. and Immun., 55: 2348-2354 (1987).
- 8.- Colln, F.R., Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Trigo, T. F. y Merino, M.M.: Serotipos de Pasteurella haemolytica aislados de pulmones neumónicos de ovinos en México. Rev. Latinoam. Microbiol. 29(3): 231-234 (1987).
- 9.- Collins, M.T., Suárez, G.F.: Effect of Hydrocortisone on Circulating lymphocytes numbers and their mitogen-induced Blastogenesis in Lambs. Am.J.Vet.Res. 46 (4): 1-5 (1985).
- 10.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Fulton, R.W., Gentry, M.J. & Rummage, J.A.: Effect of vaccination with live or killed Pasteurella haemolytica on resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Am.J. Vet.Res. 46: 342-347 (1985).



- 11.-Confer, A.W., Panciera, R.J., Moiser, D.A.: Immunity to Pasteurella haemolytica. J.A.V.M.A. 193: 1308-1316 (1985).
- 12.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. y Fulton, R.W.: Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized Pasteurella haemolytica. Am.J.Vet.Res. 47 (8): 1853-1857 (1986).
- 13.-Cowan, S. Mcbeath, D.C.: Passive protection of lamb against septicemic pasterellosis. Vet.Rec., 11: 185-186 (1982).
- 14.-Craft, D.L., Changappa, M.M., Carte, G.R.: Differentiation of Pasteurella haemolytica biotypes A and T with lectins. Vet.Rec. 120: 393 (1987).
- 15.-Derek, A.M., Simons, K.R., Confer, A.W., Panciera, R.J. and Clinkenbeard, K.D.: Pasteurella haemolytica antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infect. Immun. 572: 711-716 (1989).
- 16.-Durkham, J.A., Confer, A.W., Mosier, D.A., Lessley, B.A.: Comparison of the antigens associated with saline solution, potassium thiocyanate and sodium salicylate extract of Pasteurella haemolytica serotype 1. Am.J.Vet.Res. 47 (9): 1946-1651 (1986).
- 17.-Filion, L.A., McGuire, R.L., Babiuk, L.A.: Non specific suppressive effect of bovine herpes virus type 1 on bovine leucocyte function. Infect Immun. 42: 106-112 (1983).
- 18.-Filion, L.G., Wilson, P.J. and Bielefeldt-Ohmann: The possible role of stress on the induction of pneumonic pasteurellosis. Can. J. Comp.Med. 48: 268-274 (1984).
- 19.-Fraser, J., Lairds, S. and Gilmour, N.J.L.: A new serotype (biotype T) of Pasteurella haemolytica Res.Vet.Sci. 32: 127-128 (1982).
- 20.-Freind, S.C.W., Wilkie, B.N., Thomas, R.G.: Bovine pneumonic pasteurellosis: Experimental induction in vaccinated and non-vaccinate calves. Can.J.Comp.Med. 41: 77-83 (1977).
- 21.-Gentry, M.J., Confer, A.W., & Kaps, J.A.: Simple visual assay for determination of Pasteurella haemolytica cytotoxic neutralization antibody titers in cattle sera. J.Clin.Microbiol. 22: 968-972 (1985).

- 22.-Gillespie, J.H., Timoney, J.F.: Hagan y Bruner: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. La Prensa Médica Mexicana, S.A. 4ta ed., México, 1983.
- 23.-Glynn, H.F., Weissman, G.E.: Rapid plate agglutination procedure for serotyping Pasteurella haemolytica. J.Clin.Microbiol. 7 (2):142-145 (1978).
- 24.-Gresham, C.N., Confer, A.W., Bush, L.J., Rummage, J.A.: Serum and colostrum antibody to Pasteurella species in dairy cattle. Am.J.Vet.Res. 45: 11 (1984).
- 25.-Hernández, C.D.: Causas más frecuentes de mortalidad en corderos en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (C.O.P.E.A.). Tesis de licenciatura. Fac.de Med.Vet.y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1984.
- 26.-Hernández, Z.J., Tórtora, P.J., Martínez, H.A. y Pijoan, A.P.: Determinación de las principales causas de mortalidad en corderos en explotaciones del Estado de México. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1985. Fac. de Medicina. UNAM, México, D.F., 1985. SARH-UNAM, Mexico, D.F. (1985).
- 27.-Jensen, R.R., Pierson, P.E., Weibel, J.C., Tucker, J.D., Swift, B.L.: Middle ear infection in feedlot lambs. J.A.V.M.A. 181 (8): 805-7 (1982).
- 28.-Jones, C.D.: Proliferation of Pasteurella haemolytica in the calf respiratory tract after an abrupt change in climate. Res. Vet. Sci. 42: 179-186 (1987).
- 29.-Kaehler, K.L., Markham, R.J.F., Muscoplat, C.C.: Evidence of special specificity in the cytosidal effect of Pasteurella haemolytica. Infect.Immun. 30: 615-616 (1980).
- 30.-Keiss, R.E., Will, D.H., Collier, J.R.: Skin Toxicity and hemodynamic properties of Endotoxin derived from Pasteurella haemolytica. Am.J.Vet.Res. 25 (107): 935-941 (1964).
- 31.-LeaMaster, B.R., Evermann, J.F., Lehmkuhl, H.D.: Identification of adenovirus types five and six in an epizootic of respiratory tract diseases in recently weaned lambs. J.A.V.M.A. 190 (12): 1545-7 (1987).
- 32.-Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, P.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193: 265-275 (1951).

- 33.-Malone, F.E., MacCullough, S.J., MacLoughlin, M.T., Ball, H.J., OHagan, J., Neill, S.D.: Infectious agents in respiratory disease of housed fattening lambs of Northern Ireland. Vet.Rec. 122 (9): 203-7 (1988).
- 34.-Markham, R.J., Wilkie, B.N.: Interaction between Pasteurella haemolytica and bovine alveolar macrophages. Cytotoxic effect on macrophage and impaired phagocytosis. Am.J.Vet.Res. 41: 18-22 (1980).
- 35.-Martínez, H.A., Ochoa, U.G., Hernández, J.S., Tórtora, P.J. y Pijoan, A.P.: Principales agentes bacterianos aislados en cadáveres de corderos del Estado de México. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1985. Fac. de Medicina, UNAM México, D.f., 1985. 68. SARH-UNAM, México, D.F., (1985).
- 36.-Montes de Oca, J.R., Velázquez, O.V. y Martínez, R.L.: Causas de mortalidad en corderos de 0 a 90 días en el Valle de Toluca. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1985. Fac. de Med. UNAM México, D.F. (1985).
- 37.-Morck, D.W., Raybould, T.J.G., Acres, S.D., Babiuk, L.A., Nelligan, J. and Costerton, J.W.: Electron Microscopic Description of Glycocalix and Fimbriae on the surface of Pasteurella haemolytica A-1. Can. J. Vet.Res. 51: 83-88 (1987).
- 38.-Moreno, Ch.R.: Estado actual y perspectivas de la producción ovina en México. Vet.Mex. 7: 136-141 (1976).
- 39.-Morilla, A.: Inmunología Veterinaria. Ed. Diana México D.F., 1976.
- 40.-Morrison, D.C, and Ullevitch, R.J.: The effects of bacterial endotoxins on mast mediation systems. Am.J.Pathol. 93: 527-618 (1978).
- 41.-Opdebeeck, J.: Mammary Gland Immunity. J.A.V.M.A. 181: 10 (1982).
- 42.-Padilla, P.J.: Causas de mortalidad en corderos de la zona del Ajusco, D.F. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 1979.
- 43.-Pérez, G.: Evaluación de la respuesta inmune por titulación de anticuerpos en el calostor de ovinos del Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria, bacterinizados en tres etapas de la gestación. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1986

- 44.-Ramírez, R. y Pijoan, A.P.: Estudios sobre la incidencia de neumonías en ovinos y caprinos sacrificados en 5 rastros. Reunión Anual de Med. Vet. en México. México, D.F., 1976.
- 45.-Ramírez, R., Tapia, H.L., Angulo, B.G. : Contribución al estudio de algunas causas de muerte en ovinos lactantes (estudio preliminar). Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1984. Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional. 1984 UNAM-SARH México, D.F., 1984.
- 46.-Reyes, C.P.: Diseño de experimentos aplicados. 2nda ed. Ed. Trillas México, D.F., 1992.
- 47.-SAS Institute Inc.: SAS User's Guide. Basics, Cary. SAS Institute Inc., North Carolina, 1982.
- 48.-Schellekens, J.F.F., Kalter, E.S., Vreede, R.W. and Verhoef, J.: Host-parasite interaction in sericus infections due to gram negative bacteriae. Antonie Van Leeuwenhoek 50: 701-710 (1984).
- 49.-Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Evidence for Pasteurella haemolytica cytotoxin as a product of actively growing bacteriae. Am.J.Vet.Res. 46: 1212-1214 (1985).
- 50.-Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Pasteurella haemolytica cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by type specific rabbit antisera. Am.J.Vet.Res. 44: 715-719 (1983).
- 51.-Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Vaccination of calves with leucotoxic culture supernatant from Pasteurella haemolytica. Can.Vet.Res. 52: 30-36 (1988).
- 52.-Sultan, F.I., Aitken, I.D.: The tonsillar carriage of Pasteurella haemolytica in lambs. J.Comp.Pathol. 95 (2): 193-201 (1985).
- 53.-Sutherland, A.D., Donachie, G.E., Jones, H.Q.: A Crude Cytotoxin protects sheep against experimental Pasteurella haemolytica serotype A-2 infection. Vet.Microbiol. 19: 175-181 (1989).
- 54.-Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. 2nda ed. Ed. Interamericana, México, D.F. 1986.
- 55.-Trigo, J.F. y Romero, J.: La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. Vet.Mex. 17: 116-119 (1986).

- 56.-Trigo, T.E.: Diagnóstico, patogénesis y control de las neumonías en ovinos. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1984. Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional, 1984. 276-277. UNAM-SARH México, D.F., (1984).
- 57.-Wells, P.W., Dawson, A., Smith, W.D. and Smith, B.S.: Transfer of IgG from plasma to nasal secretions in newborn lambs. Vet. Rec. 97:455 (1975).
- 58.-Wilkie, B.N.: Respiratory tract immune response to microbial pathogens. J.A.V.M.A. 181: 1074-1079 (1982).