



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



TITULACION DE ANTICUERPOS A LA APLICACION DE UNA
AUTOBACTERINA DE PASTEURELLA MULTOCIDA TIPO D
EN EL MODULO DE CUNICULTURA DE LA F.E.S.-C.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

PEDRO DOMINGUEZ THOMPSON

DIRECTOR: MC. MVZ. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ

ASESORES: MVZ. SILVIANO TREJO NUREZ

MVZ. MARIA MAGDALENA ZAMORA FONSECA

25
24

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.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVO.....	15
MATERIAL Y METODOS.....	16
RESULTADOS.....	19
DISCUSION.....	35
CONCLUSION.....	38
RECOMENDACIONES.....	39
APENDICE.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	47

I N D I C E

D E

T A B L A S

Composición de la Carne.....	3
Características de los tipos capsulares.....	5
Tabla Comparativa de Medias y Desviación Estandar.....	25
Tabla de la Distribución de Frecuencias de la Primera Etapa....	29
Tabla de la Distribución de Frecuencias de la Primera Etapa....	30
Tabla de Anticuerpos por Raza Primera y Segunda Etapa.....	36

I N D I C E
D E
C U A D R O S

Titulo de Ac. de la Primera Etapa.....	21
Titulo de Ac. de la Primera Etapa de las Razas.....	22
Titulo de Ac. de la Segunda Etapa.....	23
Titulo de Ac. de la Segunda Etapa de las Razas.....	24
Medias por Raza de la Primera Etapa.....	27
Medias por Raza de la Segunda Etapa.....	28
Distribución de Frecuencias de la Primera Etapa.....	31
Distribución de Frecuencias de la Segunda Etapa.....	32

Resumen

El presente trabajo se realizó con el objeto de evaluar el nivel de anticuerpos en conejos, a la aplicación de una autobacterina de Pasteurella multocida tipo D.

La experimentación se llevo a cabo en el Módulo de Cunicultura y el Laboratorio de Microbiología de la F.E.S.-Cuautitlán (U.N.A.M.). La autobacterina se aplicó en 100 conejos reproductores, 12 machos y 86 hembras de las razas Nueva Zelanda, Chinchilla y California, inyectándose por vía subcutánea a una dosis de 1 ml cada uno, con una reinmunización a los 15 días y dejándose 5 controles.

Para evaluar el nivel de anticuerpos se utilizó la prueba de hemoaglutinación pasiva. Se sangraron 73 conejos (no se pudieron completar los 100 conejos a consecuencia de que se alejaban del rango de tiempo para evaluar los títulos de anticuerpos), dividiéndose en dos etapas a los 30 días se sangraron del conejo 1 al 51 y los 5 controles, en la segunda etapa se sangraron del 52 al 73 a los 60 días, de estas muestras se obtuvieron los sueros para la prueba, utilizando eritrocitos teñidos y sensibilizados con un antígeno descapsulado usando diluciones de: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256.

La prueba arrojó los siguientes resultados. En la primera etapa (30 días), las concentraciones fueron: 2 conejos con concentración 1:4, 23 conejos con concentración 1:8, 14 conejos con concentración 1:16, 11 conejos concentración 1:32 y 1 conejo con concentración 1:64. En la segunda etapa (60 días) las concentraciones fueron: 3 conejos con concentración 1:4, 12 conejos con concentración 1:8, 5 conejos con concentración 1:16, 1 conejo con concentración 1:32 y 1 conejo con concentración 1:64.

En cuanto a los controles todos tuvieron una concentración de 1:4 sin ninguna variación, con 2 de raza Nueva Zelanda, 2 de raza Chinchilla y 1 de raza California.

En la estadística descriptiva, a los resultados de las concentraciones se convirtieron por medio de logaritmos a números naturales para facilitar su manejo estadístico, graficación y prueba de hipótesis. La Media para la primera etapa dio 2.6 con una Desviación Estandar de 0.6365, para la segunda etapa se obtuvo una media de 2.4 y una desviación estandar de 0.6984 y para los controles por no sufrir variación se quedó con una media de 1.39 y una desviación estandar de 0.000.

En la distribución de frecuencia, para la primera etapa con un límite de clase de uno se obtuvo una tendencia a la derecha y en la segunda etapa también con un límite de clase de uno tuvo una tendencia a la izquierda a causa de un ascenso de anticuerpos en la primera y un descenso en la segunda etapa.

Para la prueba de hipótesis dando un nivel de confianza de 0.05, utilizando a $H_0: \mu = \bar{x}$ y $H_1: \mu \neq \bar{x}$, aceptando H_1 debido a que se obtuvo una probabilidad menor a la H_0 , para las 2 etapas.

INTRODUCCION

Importancia económica del Conejo

La industrialización del conejo en nuestro país debe adquirir mayor importancia, con un consumo per capita de 0.0028 g según la FAO y ante el aumento vertiginoso de la población en México a razón de un índice de crecimiento anual de 3.2% (49). Esta especie tiene características que la hacen idónea para incrementar el consumo de carne en el país como son, su gran prolificidad (7 partos anuales con 7 gazapos por camada en promedio), desarrollo rápido (sacrificio a los 2.5 meses), carne rica en proteínas y pobre en grasas y contenido en calorías. (ver la Tabla No.1) (22). Surge entonces la imperiosa necesidad de incrementar la producción de carne para el consumo humano y atender la enorme demanda de nuevas fuentes de trabajo abriéndose a la cunicultura un gran campo de actividad socio-económica: Su versátil alimentación un bajo índice de conversión alimento/carne, reducidas exigencias de alojamiento, una excelente capacidad reproductora y la calidad de sus productos que propicia el completo aprovechamiento de los mismos: por lo tanto lo hace una especie muy atractiva para su explotación y una alternativa económica a futuro (8).

La carne de conejo es una fuerte opción de proteína común para la alimentación humana; la piel y el pelo rinden mayores y mejores beneficios en la confección de prendas de vestir y el estiércol al incrementar su producción, podrá ser aprovechado frecuentemente en la fertilización de las tierras (8).

TABLA No. 1
COMPOSICION DE LA CARNE POR 100 g

	Calorias	Proteinas	Grasas	Ca	P	Fe	Na	K
		g	g	mg	mg	mg	mg	mg
*Buey	189	18	13	10	200	2	100	350
*Cordero	293	17	25	10	200	3	100	350
*Cerdo	280	16	24	10	200	2	100	350
*Pollo	125	20	5	10	200	2	100	300
*Conejo	174	21	10	10	200	2	50	300

Las enfermedades son actualmente uno de los principales obstáculos para el éxito de la explotación cunicola, debido a las cuantiosas pérdidas económicas que pueden ocasionar al cunicultor; por concepto de muertes, trastornos en el crecimiento, disminución de peso, gastos en medicamentos etc. (como la Enfermedad Hemorrágica de los conejos que causo gran pérdida económica a los cunicultores nacionales); para su prevención y control adecuados es necesario el conocimiento de sus causas, peculiaridades de transmisión, efectos morbosos, aplicación de medidas de sanidad animal y tratamiento (8).

Los problemas respiratorios, son una de las causas más importantes en las enfermedades, que afectan la cunicultura y principalmente uno de sus agentes causales es la Pasteurella multocida.

Características del agente

El genero Pasteurella son pequeños bacilos o cocobacilos gram-negativos. Los cuales no tienen motilidad, no esporulan, anaerobios facultativo y fermentativos (27). La forma que predomina en los cultivos y en los frotis de tejidos infectados son típicos bacilos cortos, ovoides y reqordetes (13).

La Pasteurella multocida puede estar como comensal en vías respiratorias altas y en el tracto digestivo de numerosas especies animales (13,5,59). Son agentes que causan septicemia hemorrágica e infecciones en el tracto respiratorio de los animales muchas veces asociados con otros agentes (2,58).

Existen cuatro serotipos capsulares (A,B,D,E) que han sido identificados en los cultivos animales como los productores de enfermedades ver Tabla No. 2 (7). La capsula mucoide (Acido Hialurónico) es importante para la virulencia y aparentemente sirve como la protección de los antígenos, inhibe la fagocitosis y la proteína intracelular que la compone evita la acción de los polimorfonucleares (58). En México se han encontrado las tipo A y D que son las principales causantes de enfermedades en varias especies animales (13,58).

TABLA NO. 2

```

*****
*
* Clasificación de los diferentes tipos Capsulares de la
* Pasteurella multocida y enfermedades que causan
*
*****
*
* Tipo A Còlera aviario y muchas infecciones de varios
* animales.
*
*
* Tipo B Septicemia hemorràgica en Asia, Este Medio de
* Europa.
*
*
* Tipo D Presente en varias infecciones de muchas especies
* animales.
*
*
* Tipo E Septicemia hemorràgica de Africa Central.
*
*****

```

Estas bacterias crecen en medios de cultivo ordinarios, pero todas las formas desarrollan en medios que contengan 1400000 tisulares o sangre. Fermenten carbonhidratos, forman ácido pero no gas, son oxidasa y catalasa positivos, estos reducen nitratos a nitritos. El crecimiento aparece a las 14-48 horas de incubación (a veces hasta en 12 horas). Las colonias son de tamaño variable dependiendo de la especie, en general, miden de 1-3 mm de diametro; son circulares grisáceas y no hemolíticas. Algunas cepas producen colonias mucoides (59,27,44).

Transmisión y Factores para su aparición

La pasteurellosis es una enfermedad que afecta a muchas especies, tales como: bovinos, ovinos, caninos, conejos, aves etc. (2). La transmisión en conejos ha sido demostrada a nivel experimental, por medio ambiente controlado a una temperatura de 18° - 20°C y una humedad relativa de 58 - 80 %, ó también, con una temperatura de 16° - 22°C y una humedad relativa de 46 - 88 %; pudiéndose demostrar que se transmite rapidamente en animales con fase aguda de la enfermedad, situación que no ocurre con animales infectados de manera crónica. Esta enfermedad se considera muy contagiosa, transmitiéndose por contacto directo o indirecto; aparentemente, los conejos desarrollan poca inmunidad después de la infección. Algunos animales son portadores sanos y probablemente perpetúan la enfermedad en las conejeras (17,27).

De igual manera se discute los aspectos que favorecen la presentación de la enfermedad como son la nutrición, medio ambiente, manejo, factores endogenos y virulencia del agente (33,42).

La edad es otro factor predisponente y más aún cuando se combinan con otros agentes como: Bordetella bronchiseptica, Fusobacterium necrophorum, Pasteurella haemolytica etc., haciendo más difíciles los cuadros agudos de la enfermedad sobre todo en edades de 2-4 meses y a los 10 meses se presentan sólo casos clínicos en vías respiratorias altas (16), pudiendo complicarse a cuadros como: neumonías, conjuntivitis, metritis, orquitis, abscesos cutaneos, otitis que se explicaran más adelante.

Patogenia

Las especies de pasterela son parte normal de la flora de los tractos respiratorios y gastrointestinal de muchas especies de animales domésticos y no domésticos (5). La transmisión del agente infectante de animal a animal depende de la virulencia de la bacteria. La Pasteurella multocida es frecuente que actúe como invasor secundario en las enfermedades neumónicas; sin embargo puede ser también la causa primaria de la enfermedad como la septicemia hemorrágica (13). Este agente generalmente produce la enfermedad por la rápida invasión del cuerpo del huésped que en el mayor de los casos llega a una septicemia masiva (5). Dentro de las vías de entrada experimentales de la pasterela se han investigado dos vías de inoculación la intranasal y la oral, encontrándose una mortalidad en ambas vías. El grupo que se infectó por vía oral mostró inflamación generalizada de las membranas serosas con miocarditis, nefritis intersticial, meningitis y conjuntivitis, pero presentando en la mayoría de los casos neumonía intersticial. En la inoculación intranasal produjo bronconeumonías supurativas, meningitis, abscesos cerebrales y conjuntivitis (55).

La patogénesis de la Pasteurella multocida sigue en conejos un patrón similar a otras especies. Así en diversas observaciones experimentales se demostró que el antígeno capsular de las cepas tipo D les permite resistir a la fagocitosis de los neutrófilos mientras que algunos, como la tipo A capsular, son más susceptibles al ataque neutrofilico (17). En otros experimentos más específicos se comprobó esto utilizando las cepas tipo D 3671 y 3766 las cuales permanecieron sin ser fagocitadas, mientras con las cepas tipo A R1 fué fagocitada (53,50). Esto se puede explicar según Collins, Niederbuhl y Campbell por la habilidad limitada del polimorfonuclear para destruir a la bacteria después de ser fagocitada (9).

En otro trabajo experimental in vitro se analizó la adhesión y colonización en la superficie de las mucosas, utilizando fragmentos de nariz y tráquea de conejos, empleando 4 cultivos de P. multocida capsulados de los tipos A y D, los cuales produjeron una capsula de ácido hialurónico y fibria, siendo capaces de adherirse y formar microcolonias sobre la superficie de la mucosa. Las microvellosidades de las células epiteliales y la producción de moco de las células fueron reconocidas como el lugar de adhesión, la formación de las microcolonias provoca una destrucción de los cilios (4).

Manifestaciones Clínicas

La pasteurelosis en conejos se presenta desde un cuadro catarral a una neumonía de rápida instauración, o puede manifestarse como una infección septicémica, las cuales son de curso mortal, con una duración de 1 a 8 días de acuerdo al tipo de manifestación como se enlistó a continuación (30).

Presentación de los diferentes cuadros de Pasteurelosis:

1) Sobre aguda y septicémica: Aparece bruscamente de curso muy rápido (se puede sospechar de intoxicaciones). Con gran abatimiento, el animal se aísla en la jaula (con frecuencia acurrucado), con orejas caídas, temperatura de 41-42°C. Mucosa cianótica y muere postrándose en decúbito lateral en 24 horas (52,26).

2) Aguda: Dura de dos a tres días se observa temperatura elevada, estreñimiento, respiración acelerada (51). Presentándose estornucos intermitentes, ligera decoloración amarilla de la piel y pelaje en la parte media de las patas delanteras lo cual resulta de la constante limpieza de la nariz por las descargas nasales, y esto es un indicador que ha perdido muchos líquidos (28).

La infección de los pulmones puede ocurrir por vía sanguínea o por la tráquea y causa bronconeumonía no supurativa o bronconeumonía fibropurulenta con una localización antero ventral. El conejo afectado muestra depresión y anorexia, pero con frecuencia la muerte no ocurre con signos clínicos premonitores (52,23).

3) Sub aguda: Se presenta con un cuadro de rinitis, la cual primero se manifiesta con prurito nasal, estornucos y más tarde flujo, primero claro y tornándose purulento aglutinando a los pelos. Hocico irritado rojizo y a veces con costras. En ocasiones se presenta flujo conjuntival seroso, afectando el ducto lagrimal; que posteriormente provoca una conjuntivitis está se asocia con las afecciones respiratorias, pero en ocasiones puede ocurrir por la descarga nasal abscedativa (51,23,18). Hay que señalar que los párpacos se ven inflamados y enrojecidos y a veces pegados (52).

Quando la infección es introducida en una población de conejos que no ha sido expuesta, llega a ocurrir muerte en los animales, inicialmente septicemia y después presentan los otros cuadros ya enlistados (neumonías en la mayoría de los casos) afectando animales jóvenes en el mayor de los casos. En los adultos desarrollan el cuadro agudo en las vías respiratorias altas y llegan a morir por complicaciones (28,43).

Con el tiempo, la enfermedad subsiste con una incidencia ligera de los casos, muertes esporádicas y en las infecciones su mayor parte son casos subclínicos. Sin embargo la fertilidad en las hembras disminuye, algunos machos presentan orquitis y el número de gasapos por camada es reducido (2,28,43,46). Otras manifestaciones son: metritis, meningitis, abscesos cutáneos y otitis (28,43,46).

Distribución de las lesiones

Las lesiones más características que produce la Pasteurella multocida de acuerdo a su distribución son: Rinitis, conjuntivitis, otitis media, bronconeumonía crónica, bronconeumonía aguda fibrinosa y septicemia (17); cabe destacar que las conejeras comerciales sufren grandes pérdidas económicas por esta enfermedad y otras enfermedades concomitantes (43).

La rinitis producida por P. multocida tipo D induce a osteoporosis en los cornetes nasales, a través de un procesos de osteólisis de osteoclastos e inhibición de la osteogénesis causando degeneración y muerte de osteoclastos (20); mostrando una lesión de coloración crema, exudado purulento a nivel de la fosas nasales; en los conejos con rinitis aguda muestran cornetes enrojecidos con un típico exudado presente. Esta lesión se observa de ligera a severa, con pérdida o disminución en los cornetes maxilares. Histológicamente, los huesos maxilares se observan pequeños e irregulares engrosados y tienen numerosos osteoclastos y osteoblastos con inclusión de Polimorfo Nucleares (19).

En las lesiones de otitis media, se evalúa como rutina a la necropsia de la cabeza y exponiendo la bula timpánica, la cual se observa como una infección subclínica común en este sitio. Aparentemente esto lo provoca por una infección externa que rompe el tímpano y provoca lesión en el revestimiento de la membrana timpánica originando exudado purulento y afectando demás órganos y huesos que lo rodean (temporal, meninges y sistema nervioso) (42,29).

La conjuntivitis se provoca cuando el agente penetra por el ducto lagrimal a la conjuntiva, para provocar la conjuntivitis, la córnea exhibe un enturbamiento de variable intensidad y va acompañada de una intensa inflamación edematosa del párpado (30,28).

En cuanto al estudio de las lesiones neumónicas se han realizado trabajos, donde se investigaron 40 pulmones de conejo localizándose lesiones que van desde neumonía intersticial localizada leve a bronconeumonía aguda, destacándose que en este estudio no hubo una correlación entre el tipo de microorganismo aislado y el tipo de bacteria recuperado, ya que en la mayoría de los casos había tanto anticuerpos contra P. multocida y B. bronchiseptica (43). Los pulmones llegan a presentar una cantidad variable de consolidación, usualmente de gran severidad en las regiones anteroventrales (28,63), observándose microscópicamente engrosamiento de los septos alveolares con infiltración de Polimorfo Nucleares. También hay áreas de consolidación adyacentes a bronquios y bronquiolos, así como enfisema, de igual manera se puede observar exudado mucopurulento en estos mismos tejidos. En las arterias presentan infiltración de Polimorfo Nucleares y también perivascular. La participación de estos Polimorfo Nucleares se asocia a una eventual necrosis (48).

En la septicemia hemorrágica se puede observar un pequeño aumento en el grosor de la pleura y congestión en los pulmones y algunas petequias. La consecuencia de la septicemia están relacionadas con efectos de endotoxinas e histológicamente con trombos fibrina que pueden ser observadas en el glomérulo renal. En conejos experimentales que adquirieron anticuerpos naturales, se protegen de lesiones localizadas y generalizadas por la reacción de Shwartzman (de endotoxinas), apareciendo anticuerpos contra la septicemia. En los animales jóvenes aparece raramente cuando la enfermedad ha estado presente por algún tiempo (60).

Otras lesiones hemorrágicas que se presentan son: Traqueítis, congestión del nazo; degeneración y necrosis del nigaço y ríñones (40).

Diagnóstico

El diagnóstico confirmativo de la P. multocida depende del aislamiento y la identificación del agente (15). El cultivo de material infectado da como resultado un crecimiento muy típico de colonias gris mucoides en agar sangre. Aunque la P. multocida generalmente ha sido reconocida como patógeno primario de la nariz, presumiblemente porque de las rinitis clínicas son positivas a los resultados de los cultivos (28). Holmes encontró que el 62% de los animales vestetados tomando la muestra en la faringe son positivos a este agente, en comparación con el 37.5% tomada por vía nasal (24). Sin embargo se sugiere que usando un algodoncillo con alginato de calcio fino y penetrando 3 cm dentro de la nariz, el 95% de conejos puede ser identificado (35). Otro método que da buen resultado puede ser con el lavado nasal; este puede ser con Solución Salina Fosfato Euforada, esta se introduce en la nariz, y lavandolas se colecta el líquido en cajas de petri (34).

Los diagnósticos serológicos son de valor limitado puesto que mientras hay conejos con un cuadro clínico y presentando anticuerpos aglutinantes, hay otros que no presentan cuadro alguno y por tanto se descartan para un diagnóstico presumible de pasteurelosis, quedando muy probablemente como portadores sanos (36).

Tratamiento

Los siguientes antibióticos han sido usados extensamente en el tratamiento de Pasteurelosis: Fenícilina y estreptocimina (13). La penicilina es el antibiótico de elección para todas las infecciones por Pasteurella (5)(25). Welch las ha utilizado en suero y en lavados nasales dando similares resultados tanto por vía intramuscular o subcutánea (62). Otros de los antibacterianos que dan buen resultado es la tetraciclina y oxitetraciclinas, sobre todo las de larga acción, siendo bien toleradas a una

dosis de 20 mg/kg (13,11). Las Sulfamerazinas y la Sulfametazinas son también efectivas (5); las Sulfonamidas combinadas con el metabolito N4-acetil se utiliza por vía intravenosa a una dosis de 200 mg/kg, dando buenos resultados (64). Otro antibacteriano que ha resultado efectivo en agua de bebida es la Enroflaxina que se administra en 50 ppm por 5 días o vía subcutánea 5mg/kg por 3 días (23). También la flouriquinalona y la cafalotina han sido efectivas para la terapia contra la pasterelela (5,6).

Prevención

La prevención de la pasteurelosis en conejos siempre se ha enfocado a la inmunización, buscando siempre alternativas para la utilización de vacunas vivas y bacterinas. Cabe señalar que tanto una como otra han sido poco eficaces como se ejemplifica más adelante, de igual manera las vías de inoculación, el uso de diferentes tipos de adyuvantes y la combinación de diferentes serotipos de Pasteurella multocida o la combinación con otro agente, en este caso la Bordetella bronchiseptica, son principales alternativas para la prevención de la pasteurelosis como (2,26,16).

En un claro ejemplo: la vacunación con microorganismos vivos no dan resultados satisfactorios en la prevención contra la pasteurelosis, ya que un trabajo que se llevo a cabo con P. multocida serotipo A-12, proporcionó resultados desalentadores, a consecuencia de que durante la prueba los animales desarrollaron rinitis atrofica, para posteriormente recuperarse el serotipo vacunal (53,14).

En una experimentación a nivel de campo, Spanoghe y Okerman utilizaron una Bacterina P. multocida tipo A y D, dando resultados confusos debido a la utilización de antibióticos post-inmunización (56). Estos mismos autores también utilizando una Bacterina, con adyuvante, en base oleosa; demostraron que a nivel

de campo, la vacuna no pudo proteger en forma adecuada la pasteurelosis en conejeras comerciales, pero en una prueba piloto con conejos libres de patógenos específicos proporciono resultados favorables (57).

Las vías de inoculación han jugado un papel importante en la evaluación de las vacunas, muchas de las cuales han dado resultados muy similares. Las vías más utilizadas son: intramuscular, intravenosa, intranasal, subcutánea y conjuntival; con mayor frecuencia se ha utilizado en las pruebas experimentales las vías intranasal e intramuscular, la vía intranasal se utiliza para el desafío de las vacunas que muchas veces muestra lesiones tanto en vías respiratorias altas como en pulmones (2,43).

La efectividad de las vacunas depende mucho de la utilización de los adyuvantes como, por ejemplo: Adyuvante completo de Freund, incompleto de Freund e hidróxido de aluminio, los cuales estimulan una alta respuesta del nivel de anticuerpos, esto se ha probado en vacunas para combatir la pasteurelosis en bovinos y pocas veces en conejos (3,31,1).

La combinación con otros agentes también ha sido utilizada como una alternativa para solucionar el problema, uno de los trabajos de experimentación con mejor resultados, fué el que se llevo a cabo en Corea, donde se encontró que el uso de una Bacterina formalinizada, preparada de P. multocida y Bordetella bronchiseptica aisladas de conejos con enfermedad respiratoria, produjo buenas respuestas de anticuerpos y protección contra el desafío experimental en ratones y conejos. Los anticuerpos persistieron por cinco meses después de una aplicación de refuerzo. Los anticuerpos maternos también fueron elevados. En una prueba de campo, con 300 conejos vacunados y 300 controles, 5 y 30% respectivamente desarrollaron enfermedad respiratoria (15).

La utilización de un extracto de P. multocida con Tioscinato de Potasio, parece que ha funcionado de manera óptima en conejos Nueva Zelanda vacunados por vía intranasal e intramuscular e indicando que la vacuna es segura y efectiva (31,35).

A nivel comercial existen muchas vacunas en el mercado de E. multocida las cuales no dan la protección adecuada; debido a que son muchos los serotipos de este agente, los cuales varían en su virulencia y predominando en una zona geográfica determinada, sin que ningún biológico sea efectivo (2,28).

Control

Numerosas técnicas han sido usadas para intentar controlar y eliminar la pasteurelisis en los conejos. Agentes quimioterapéuticos como la penicilina son solamente efectivos escasamente, pero no eliminan el microorganismo del tracto respiratorio (25). Las medidas de higiene, control del estrés, sanidad, medio ambiente, iluminación, predisposición por raza, vectores, etc.: son medidas que difícilmente dan solución al problema de esta enfermedad, pero conjuntadas lo mejor posible pueden de alguna manera controlar la enfermedad (42). Otra de las alternativas es el establecimiento de conejos libres de Pasteurella multocida, esto ha tenido buenos resultados; pero sin embargo, estos conejos necesariamente han sido originados de animales con pasterela y sólo utilizan en investigaciones para las diferentes instituciones dedicadas a este fin (54,61).

OBJETIVO

Evaluación de una autobacterina contra Pasteurella multocida tipo D, en conejos reproductores por medio de la prueba de hemoaglutinación pasiva.

MATERIAL Y METODOS

Elaboración de la autobacterina

- 1.- Las bacterias se cultivaron por el aislamiento, en los conejos reproductores del Módulo de Cunicultura de la F.E.S.-C.
- 2.- En medio de BHI estéril, se inoculó el cultivo de F. multocida tipo D, el cual se colocó en Baño María a 37°C con agitación continua por 12 horas.
- 3.- El cultivo se inactiva con formal al 0.4% y este se deja incubar a 37°C por 24 horas, realizándose una tinción de Gram para observar su pureza y determinar su inocuidad, inoculándose a ratones albinos de 80 g de peso, por vía subcutánea e intraperitoneal, los cuales quedaron bajo observación por 48 horas.
- 4.- Se determinó y concentró el cultivo con el grefelómetro de Mackfarland, quedando en una concentración de 10⁸ (12).
- 5.- Posteriormente se agregó 11.6 ml de AlCl al 10% al cultivo inactivado como adyuvante; posteriormente se agregó NaOH al 10% midiéndose con tiras reactivas hasta obtener un pH de 7.
- 6.- Preparada la autobacterina se conservó en frascos color ambar de 500 ml con tapón de seguridad y se mantuvo en refrigeración por 48 horas, evaluando pureza e inocuidad (38).

Immunización de los conejos

- 1.- Se utilizaron 100 conejos del módulo de la F.E.S.-C., el módulo tiene una orientación norte-sur, fabricado de cemento, techo de lamina de asbesto, con un clima templado a una temperatura de 18g a 24gC en los meses de diciembre-febrero que se llevo acabó la experimentación, los conejos son alimentados con un alimento comercial llamado Conijetina fabricado por La Hacienda. Estan divididos en conejeras individuales, las cuales estan formadas en líneas a lo largo del módulo, y estan designadas con las letras de la A a la D.

Para la experimentación se utilizaron las líneas A y B. En las cuales se encuentran las siguientes razas y sexo:

Línea A:	18 conejos Nueva Zelanda	16 hembras y 2 machos
	18 conejos Chinchillas	16 hembras y 2 machos
	18 conejos California	16 hembras y 2 machos
Línea B:	18 conejos Nueva Zelanda	16 hembras y 2 machos
	18 conejos Chinchillas	16 hembras y 2 machos
	18 conejos California	16 hembras y 2 machos

Con un promedio de 2 años de edad.

La aplicación de la autobacterina fue por vía subcutánea en el dorso con una dosis de 1 ml por conejo. Se dieron 2 vacunaciones, a los 0 y 15 y días.

Sangrado de los conejos para la obtención de suero.

1.- Se sangraron 75 conejos entre machos y hembras de las razas Nueva Zelanda, Chinchilla y California, a los 30 y 60 días post inmunización, por la vena marginal de la oreja, tomando muestras de 2-3 ml.

2.- Para obtener el suero se dejaron las muestras a Baño María a 37°C por hora y media.

3.- Posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos para separar el suero del coágulo. El suero obtenido se depositó en viales estériles con tapón al vacío y se congelaron para posteriormente utilizados en la prueba de hemaglutinación pasiva.

Prueba de hemoaglutinación pasiva

1.- La determinación del título de anticuerpos se realizó en cada grupo mediante la técnica de hemoaglutinación pasiva, con eritrocitos tipo O humano tanados y sensibilizados con un antígeno descapsulado.

2.- Se utilizaron microplacas de titulación con fondo en U, efectuando diluciones dobles de suero.

3.- A todas las pozos con fondo en U, se depositaron 100 microlitros de suero normal de conejo al 1%. Posteriormente se tomaron 100 microlitros con el suero problema y se colocaron en la primera poza mezclándolos completamente y transfiriendo 100 microlitros a la siguiente poza, repitiendo este proceso lo cual automáticamente nos proporciona las siguientes diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, los últimos 100 microlitros se desecnan.

4.- A cada dilución de suero se agregaron una suspensión de eritrocitos tanados al 1.5% y sensibilizados con antígenos descapsulados de E. multocida (21,45).

RESULTADOS

El total de los conejos sangrados fueron 73, no se pudieron completar los 100 porque se alejaban del rango de tiempo que se estableció para la prueba (60 días) y por lo tanto se podían modificar los resultados que se esperaban.

Los niveles de anticuerpos obtenidos en la primera etapa (30 días post inmunización) de los 51 conejos se presentaron con los siguientes resultados: 23 conejos con 1:8, 14 conejos con 1:16, 11 conejos con 1:32, 2 conejos con 1:4, 1 conejo con 1:64. (Ver Cuadro No. 1).

Se dividieron los conejos por raza quedando con los siguientes resultados para los de la primera etapa:

Raza Nueva Zelanda: 7 conejos con 1:8, 6 conejos con 1:32, 1:16 con 5 conejos, (Ver Cuadro No. 2).

Raza Chinchilla: 8 conejos con 1:8, 4 conejos con 1:32, (Ver Cuadro No. 2).

Raza California: 3 conejos con 1:8, 5 conejos con 1:16, 2 conejos con 1:32, 1 conejo con 1:64, (Ver Cuadro No. 2).

Aparentemente la raza que obtuvo mejor nivel de anticuerpos fué la raza Nueva Zelanda y la otras 2 razas tuvieron resultados muy similares.

Para los controles que se sangraron a los 30 días junto con los de la primera etapa, que solamente fueron 5, todos tuvieron nivel de anticuerpos 1:4, siendo 2 de la raza Nueva Zelanda, 2 de la raza Chinchilla y 1 de la raza California.

Para los conejos de la 2a. etapa (60 días pos vacunación) los niveles de anticuerpos para los 22 conejos dieron los siguientes resultados: 12 conejos con 1:8, 5 conejos con 1:16, 3 conejos con 1:4, 1 conejo con 1:32, 1 conejo con 1:64, (Ver Cuadro No. 3).

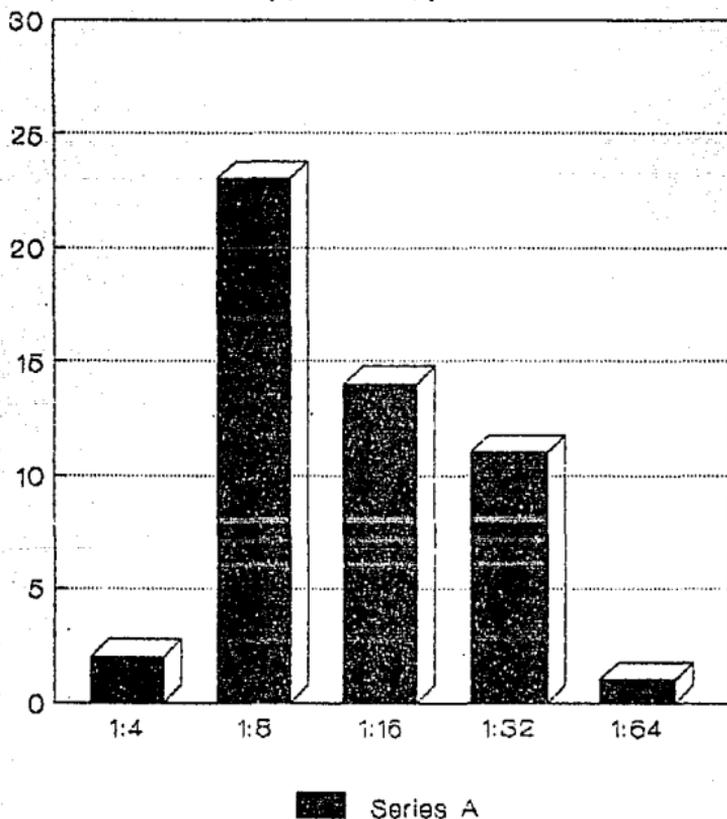
De igual manera se dividieron los conejos por raza, en este grupo sólo se ocuparon 2 razas quedando con los siguientes resultados:

Raza Nueva Zelanda: 6 conejos con 1:8, 2 conejos con 2, 1 conejo con 1:32, (Ver Cuadro No. 4).

Raza Chinchilla: 6 conejos con 1:8, 4 conejos con 1:4, 3 conejos con 1:16, 1 conejo con 1:64, (Ver Cuadro No. 4).

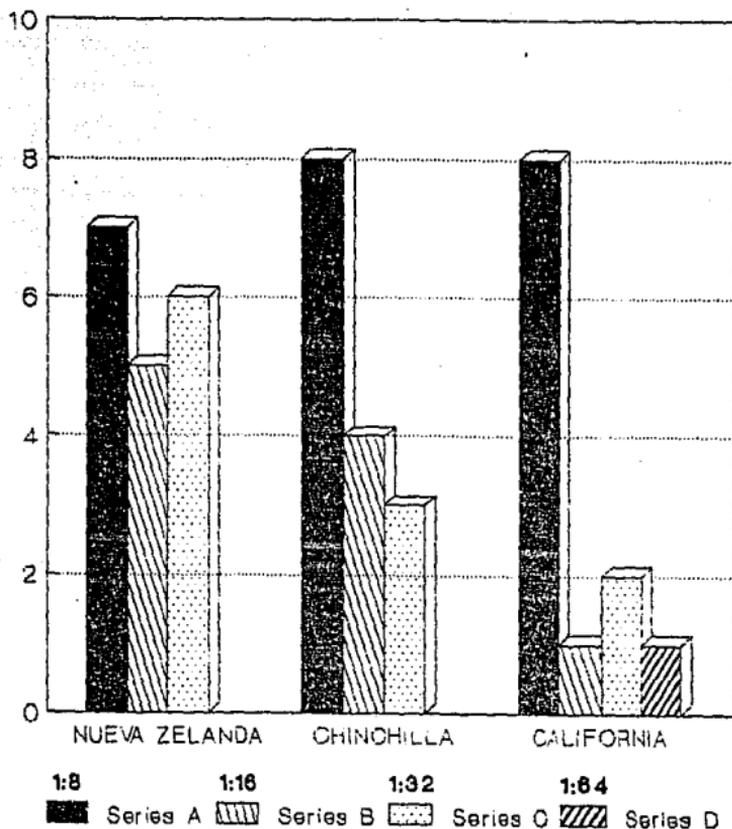
CUADRO No.1

TITULO DE Ag. DE LA PRIMER ETAPA (30 DIAS)



(n-51)

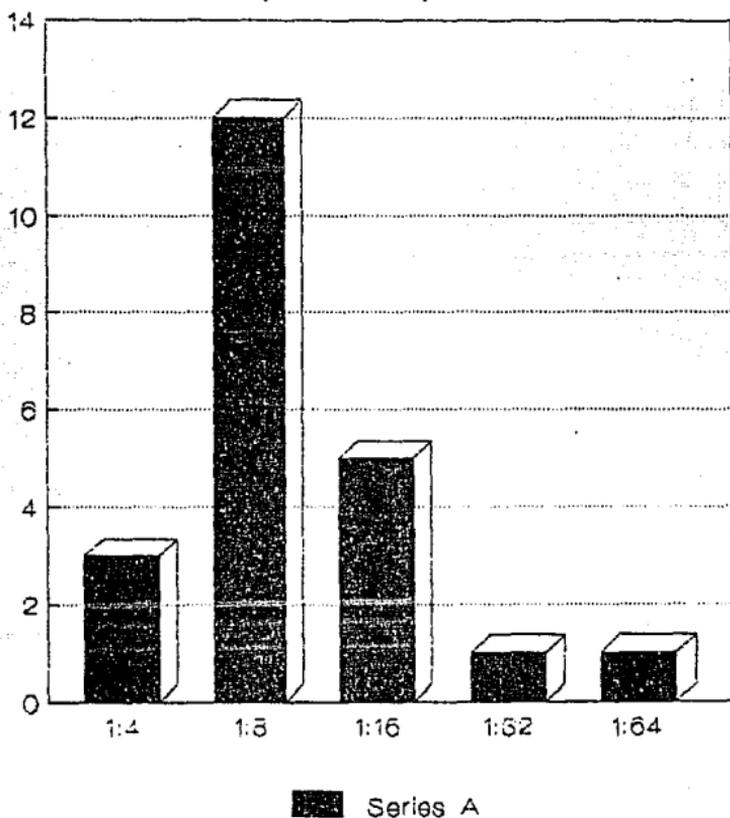
CUADRO No. 2
TITULO DE Ac. DE LAS RAZAS
DE LA PRIMERA ETAPA



(n=51)

CUADRO No. 3

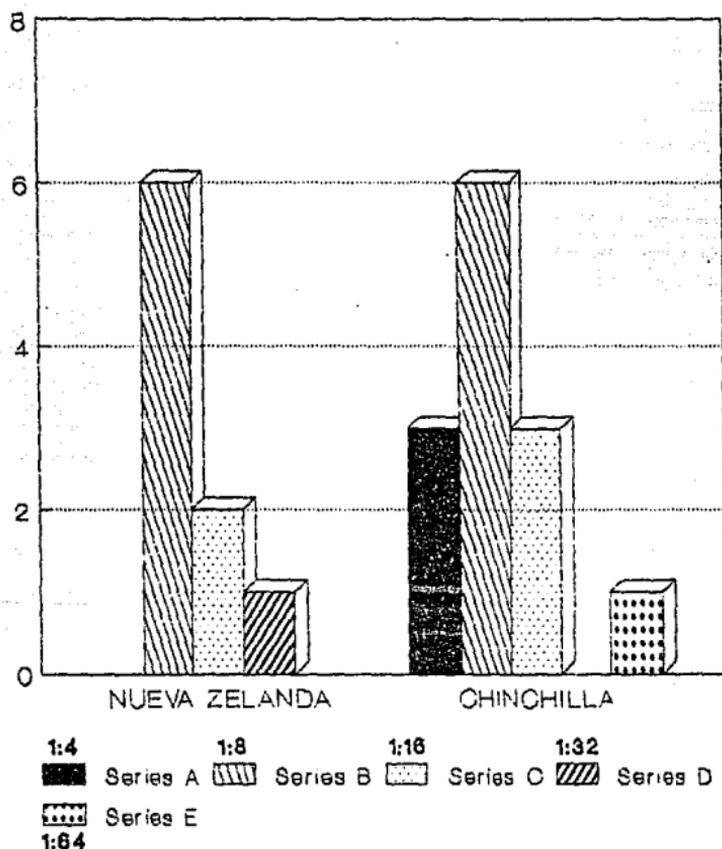
TITULO DE Ac. DE LA SEGUNDA ETAPA (60 DIAS)



n(22)

CUADRO No. 4

TITULO DE Ac. DE LAS RAZAS DE LA SEGUNDA ETAPA



(n=22)

Estadística Descriptiva

En la estadística descriptiva, los resultados de los niveles de anticuerpos se transformaron por medio de un logaritmo a números naturales con el sistema Microstat y así facilitar el manejo de las funciones estadísticas y gráficas.

Para cada uno de los grupos, se pudo encontrar que la media de los anticuerpos. Para la primera etapa fue la mayor 2.6 con una desviación estandar de 0.6365; en la segunda etapa disminuyó la media a 2.4 con una desviación estandar de 0.6984 y por último en los controles no se encuentra un nivel constante con media de 1.39 y desviación estandar de 0.000, ya que no sufre ninguna variación en los niveles como las otras dos etapas. (Ver Tabla No. 3).

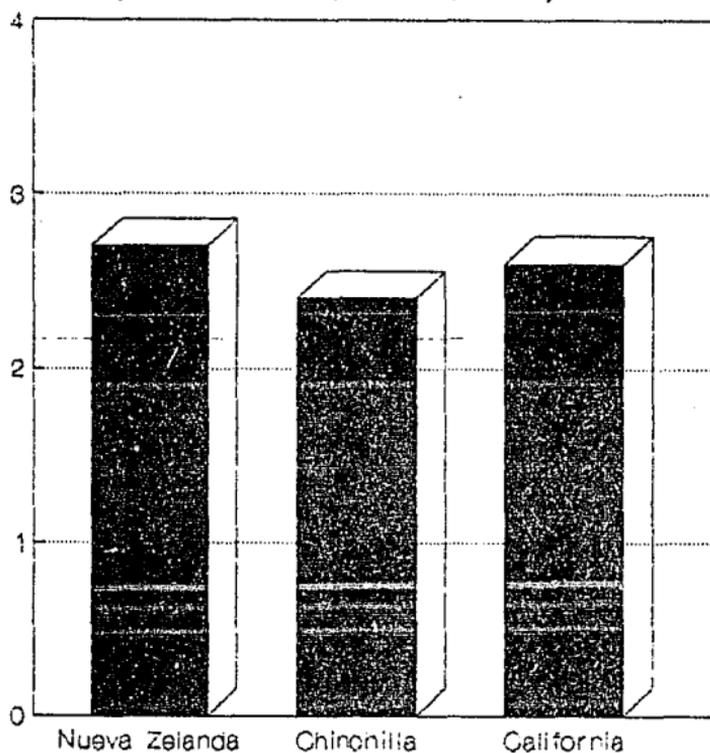
TABLA No. 3

No. de animales	Máximo de Titulo	Mínimo de Titulo	Media	Desviación Estándar
51	1.39	4.16	2.6	0.6365
22	1.39	4.16	2.4	0.6984
5	1.39	4.16	1.39	0.000

También se obtuvo la media por raza, para los de la primera etapa con los siguientes resultados, la raza Nueva Zelanda dio una media de 2.7, la raza Chinchilla con una media de 2.4 y la raza California con una media de 2.6, (Ver Cuadro No. 3).

Para los de la segunda etapa se obtuvieron, de la raza Nueva Zelanda con 2.38 y la raza Chinchilla con 2.4, (de la raza California no se obtuvo, porque el sangrado se tomaría con más tiempo alejándose del parametro de los 60 días), (Ver Cuadro No. 6).

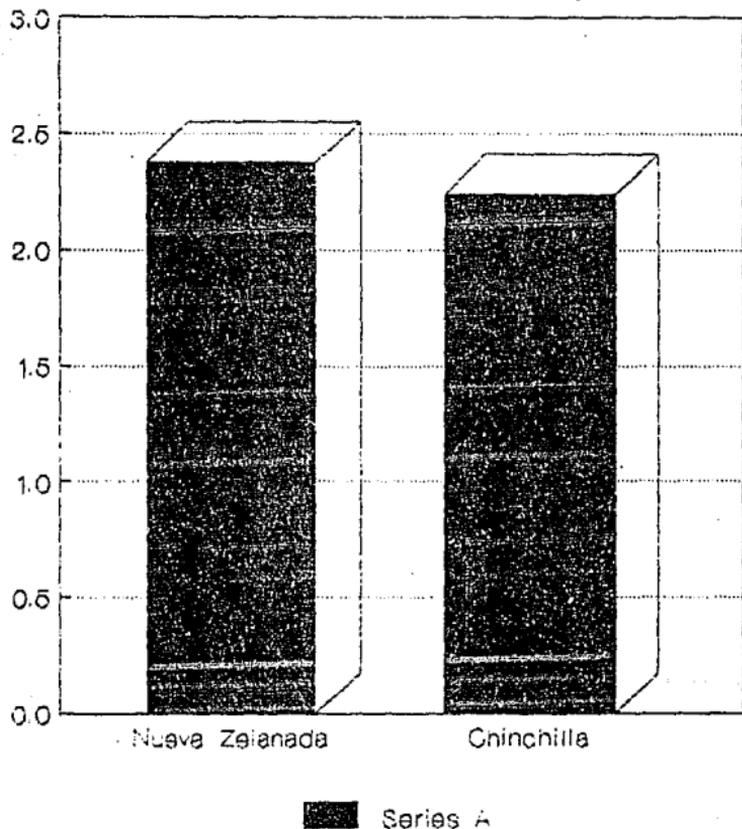
CUADRO No. 5
MEDIAS POR RAZA DE LA PRIMERA ETAPA
(LOGARITMO NATURAL)



■ Series A

(n-51)

CUADRO No. 6
MEDIAS POR RAZA DE LA SEGUNDA ETAPA
(LOGARITMO NATURAL)



(n-22)

Distribución de Frecuencias.

La distribución de frecuencia de la primera etapa, es normal pero cargada hacia la derecha, debido al ascenso en la producción de anticuerpos. La distribución de la segunda etapa, es una curva normal, pero cargada a la izquierda por el descenso en los anticuerpos. A éstas distribuciones se les asignó un intervalo de clases con el valor de 1. Los conejos controles presentaron datos uniformes quedando todos con 1.39, (Ver Tablas No. 4 y No. 5, Cuadros No. 7 y No. 8).

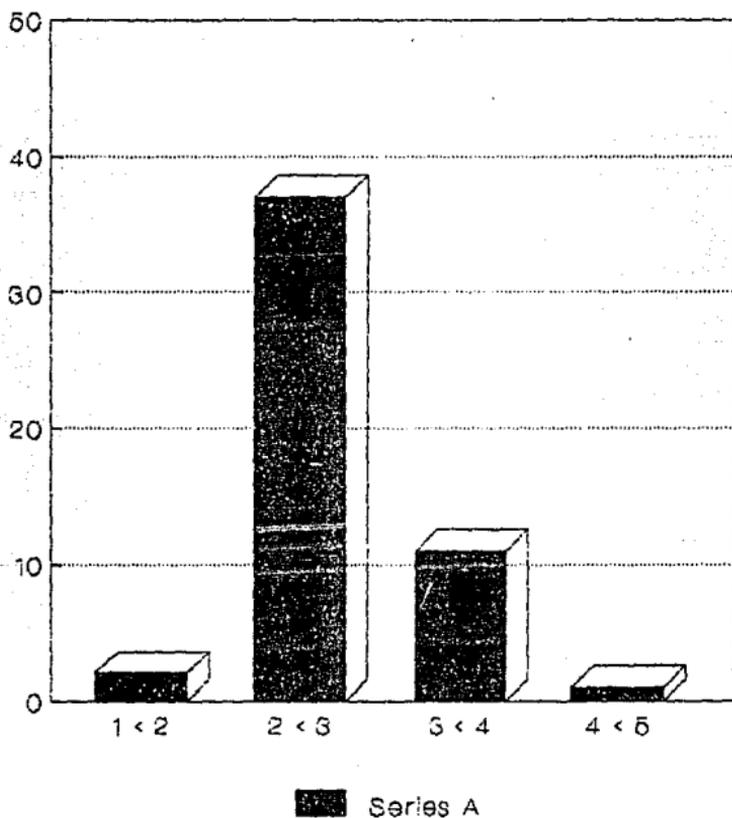
TABLA No. 4

```

*****
*
*
*
*   Tabla de la Distribución de Frecuencias de la Primera Etapa
*
*
*****
*
*
*   Limite de Clases      Frecuencia  Porcentaje  Porcentaje de
*                               Frecuencia  Frecuencia
*
*       1 < 2              2           3.92         2   3.92
*
*       2 < 3              37          72.55        39  76.47
*
*       3 < 4              11          21.57        50  98.04
*
*       4 < 5               1           1.96        51 100.00
*
*                               Total      51          100.00
*****
    
```


CUADRO No. 7

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA PRIMERA ETAPA

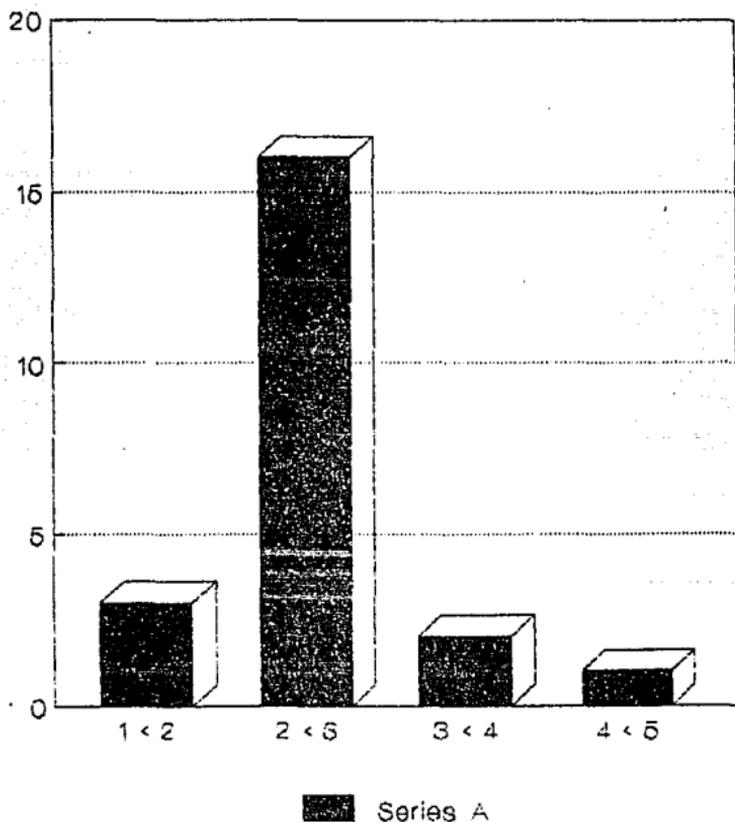


LIMITE DE CLASE DE UNO

CUADRO No. 8

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS

De la Segunda Etapa



LIMITE DE CLASE DE UNO

Prueba de Hipótesis

Dentro de los estudios estadísticos que se llevaron a cabo fue la prueba de hipótesis para las medias de cada etapa, designándoles un nivel de confianza de 0.05. Las hipótesis fueron:

Ho: $\mu = \bar{X}$

Hi: $\mu \neq \bar{X}$

Media contra valor de la hipótesis del caso 1 a 51.

Nivel de Confianza = 0.0500
Media = 2.6
Desviación Estandar = 0.6365
Error en Desviación Estandar = 0.0891
Número de casos = 51 (Casos de 1 a 51)
Grados de libertad = 50

Variable Testigo: Titulo de anticuerpo

Probabilidad= 5.0000 E-14

Media contra valor de la hipótesis del caso 52 al 73.

Valor de la hipótesis = 0.0500
Media = 2.3630
Desviación Estandar = 0.6984
Error en Desviación Estandar = 0.1469
Número de casos = 22
Grados de libertad = 21

Variable testigo: Titulo de anticuerpos.

Probabilidad= 2.550 E-13

Media contra el valor de la hipótesis de los controles.

Valor de la hipótesis = 0.0500
Media = 1.3863
Desviación Estandar = 0.0000
Error en la desviación Estandar = 0.0000
Número de casos = 5
Grados de Libertad = 4

Variable testigo: Titulo de anticuerpos

Probabilidad= 9999.9999

Estos resultados indican que H_1 se acepta debido a que se obtuvo una probabilidad menor a 0.05, para el grupo de la primera y segunda etapa.

En el grupo de los controles se obtuvo una probabilidad igual a cero ($P=0$) por lo que se acepta H_0 .

Discusión

La detección de anticuerpos en el suero de un animal, nos indica específicamente que a estado en contacto con el antígeno y que pudo haber sucedido por una infección activa o por medio de una vacunación (38); en este caso antes de la inmunización tuvieron contacto probablemente algunos con infección activa o simplemente son portadores sanos del agente; los resultados muestran un nivel de anticuerpos de 1:8 en la gran mayoría de los conejos tanto para los de la primera etapa (30 días post inmunización) y los de la 2a. etapa (60 días post inmunización) y los controles, de los cuales sólo se pudieron utilizar 5 animales, no teniendo la oportunidad de utilizar más, presentan un título de 1:4. Aunque la respuesta inducida no es satisfactoria, es evidente un ligero estímulo, pudiendo obedecer esta aparente deficiencia inmunogénica a varios factores tanto físicos como biológicos, ya sea patógenos como otros no patógenos como son: mala higiene, estrés, mala ventilación, nutrición, vectores etc. (33,42), esto impide un tanto una buena respuesta del animal, así como el control de la enfermedad.

Uno de los aspectos que cabe señalar es la predisposición por raza en la formación de anticuerpos: Para la primera etapa con más niveles de anticuerpo fué la raza Nueva Zelanda con una media de 2.7. En segundo lugar siguió la raza California con una media de 2.6. En tercer lugar, la raza Chinchilla con una media de 2.4 (Ver Tabla No.6).

Para la segunda etapa los niveles disminuyeron pero de igual manera, la raza que obtuvo mayor nivel de anticuerpos fué la raza Nueva Zelanda con una media de 2.38, seguida de la raza Chinchilla con 2.24, no se pudo obtener sangre de la raza California debido al tiempo con que se iban sangrando los animales, ya que se iban alejando del parametro de los 60 días (Ver Tabla No.6).

Estas diferencias de los niveles de anticuerpos entre raza se considera significativa, no se encontró bibliografía que pueda avalar esta diferencia, pero la gran mayoría de experimentos con Pasteurella multocida se utiliza la raza Nueva Zelanda y entonces se piensa, que por su gran exposición a este agente, éste tenga mayor capacidad para la formación de anticuerpos.

TABLA No.6

```

*****
*
*           MEDIAS DE ANTICUERPOS POR RAZA
*           PRIMERA Y SEGUNDA ETAPA
*
*****
*
*           1a. Etapa           2a. Etapa
*
* Nueva Zelanda           2.7           2.38
*
* California               2.6
*
* Chinchilla              2.4           2.24
*****

```

Otra observación que hay que señalar independientemente de la predisposición por raza, es la presentación del antígeno ya sea íntegro o fraccionado al parecer modifica grandemente la respuesta inducida. De este modo, se presume que la cápsula determina la especificidad serológica y es la que promueve la producción de anticuerpos protectores (39).

Al parecer el uso de organismos muertos no provee una adecuada protección contra la cápsula, sino únicamente contra la pared celular (40). Así mismo, Confer añade que la falta de protección observada por el uso de organismos muertos puede ser resultado de que pueda ser necesaria una interacción bacteria - hospedador para la producción de inmunidad protectora, ya sea contra componentes estructurales menores o componentes no estructurales del organismo (10).

La estadística descriptiva muestra que hay una tendencia de mayor incremento en el nivel de anticuerpos en la primera etapa, con una media de 2.6 y disminuye en la 2a. etapa con una media de 2.4, esto quiere decir que se presentó un ascenso y un descenso

en un determinado espacio de tiempo, en este caso con una diferencia de 30 días, lo cual es una caída muy vertiginosa de los niveles de anticuerpos; esto concuerda con lo esperado, ya que es muy probable que se ceba a la respuesta primaria de la producción de anticuerpos, que rápidamente descienden. Hay autores que afirman que el nivel de anticuerpos desaparece a los 47 días pos vacunación (35,31), pero hay otros autores, que aseguran que el nivel de anticuerpos contra Pasteurella multocida tipo D predomina hasta 5 meses, pero estos mismos combinaron la vacuna con el tipo A y la Kordetella bronchiseptica (15), los cuales actúan también de manera directa en la presentación de la enfermedad, esto nos lleva a pensar que este nivel se mantuvo porque se estimuló más anticuerpos, debido a que fueron más los antígenos que se presentaron al sistema inmunitario del animal, entonces se pensaría en un diseño experimental para probar si se puede mantener un nivel anticuerpos con más tiempo y evitar descensos vertiginosos anticuerpos.

Ahora si el nivel de anticuerpos desciende de manera vertiginosa, se puede plantear la siguiente pregunta ¿Cómo entonces podría convenir inmunizar a estos animales, debido al descenso de anticuerpos?, esto nos conduce, que si dura 2 ó 3 meses un nivel de anticuerpos óptimos en los conejos, entonces es recomendable vacunarlos, antes de las épocas donde se presenta del mayor índice de casos de pasteurelisis y sobre toda a los reproductores para mantener un nivel de anticuerpos adecuado.

La inmunización es adecuada para los animales jóvenes, que son los que presentan cuadros agudos, los más frecuentes en estos animales (16). Así también es conveniente para los reproductores porque se puede evitar bajo rendimiento reproductivos a consecuencia de lesiones como orquitis y metritis, sobre todo la aplicación de la autobacterina para los animales que no han tenido contacto con el agente y podría considerarse también aplicar la vacuna para animales de engorda, por que las lesiones que provoca la enfermedades tales como: conjuntivitis, meningitis, neumonía, traqueitis etc., disminuyendo el rendimiento de estos (2,28,46,47).

CONCLUSION

La inmunización y reinmunización de los conejos con una autobacterina es una alternativa para disminuir casos de pasteurelisis y proteger a los animales en épocas críticas, en especial a los animales que nunca se han expuesto a esta enfermedad, principalmente reproductoras y animales jóvenes; sobre todo estos últimos, ya que son los más afectados por esta enfermedad y así brindar un mejor rendimiento tanto a los animales progenitores y a los de engorda para proporcionar una mejor ganancia de peso.

La hemaglutinación pasiva es una prueba rápida y sensible, la cual como instrumento ayuda a cuantificar de una manera rápida el nivel de anticuerpos, ya sea por animal o por grupos, sirviendo tanto para evaluar que expuestos están a la enfermedad y que tan protegidos están inmunizados y no inmunizados.

RECOMENDACIONES

- 1.- Inmunizar antes de las etapas de mayor incidencia de la enfermedad (Invierno).
- 2.- Inmunizar tanto animales jóvenes como reproductores.
- 3.- Buscar alternativas para un mejor control del módulo de cunicultura, tanto controles físicos y biológicos que ayuden a mejorar la productividad de los animales.

Apéndice

Material para la Elaboración de la Autobacterina

- 1.- Medio de caldo de Infusión de Cerebro y Corazón (BHI) 250 ml estéril.
- 2.- Cultivo de Pasteurella multocida tipo D.
- 3.- Juego para la tinción Gram.
- 4.- Microscopio óptico.
- 5.- Baño María.
- 6.- Nefelómetro de Mackfarland.
- 7.- Formol al 0.4%.
- 8.- Solución de Cloruro de Aluminio (AlCl₃) al 10%.
- 9.- Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 10%.
- 10.- Pipetas de 1 ml (1/10).
- 11.- Pipetas de 10 ml.
- 12.- Asa de inoculación.
- 13.- Tiras reactivas de pH.
- 14.- Frascos ámbar estériles con tapón.
- 15.- Mecheros Bunsen.

a) En un medio de BHI estéril, se inócula el cultivo de P. multocida tipo D, el cual se colocó en Baño María a 37°C con agitación continua por 12 horas, posteriormente se realiza una tinción de Gram para observar si esta se encuentra contaminado.

b) El cultivo se inactiva con formol al 0.4% y se deja incubar a 37°C por 24 horas, realizando una tinción de Gram para determinar su pureza.

c) Para determinar su concentración, se deposita en tubo de ensaye estéril 3 ml de cultivo inactivado y se compara la densidad con los tubos de Macfarland, quedando una concentración de 10⁸.

d) Posteriormente se agrega 11.6 ml de AlCl₃ al 10% al cultivo inactivado como adyuvante (Para un litro de solución se agrega 46.6 ml de AlCl₃) con tira reactiva se mide el pH y se va agregando NaOH al 10% hasta obtener un pH de 7.

e) Preparada la autobacterina se conserva en frascos color ámbar con tapón de seguridad y dejándose en refrigeración y después realizar sus pruebas de pureza y inocuidad.

Desafío de la Autobacterina (Prueba Pureza de Inocuidad)

- 1.- 3 ratones.
- 2.- 3 cajas de petri con Agar sangre.
- 3.- Asa de inoculación.
- 4.- Jeringas insulínicas.
- 5.- Autobacterina.

a) Se inoculan dos ratones y se deja uno como control, la inoculación se hace por vía intraperitoneal y subcutánea, los cuales quedan bajo observación si hay algún tipo de reacción por 48 horas.

b) Se sembraron en dos cajas de Agar Sangre la autobacterina para observar si presenta algún crecimiento, las cuales se dejan por 12 horas a 37°C.

Sangrado de los conejos para la obtención del suero

- 1.- Jeringas sde 3 ml con aguja del número 22.
- 2.- Tubos de ensaye.
- 3.- Baño María.
- 4.- Viales estériles.
- 5.- Centrifuga.

a) El sangrado se realiza por la vena marginal de la oreja del conejo tomando una muestra de 2-3 ml.

b) Esta se depositan en tubos de ensaye inclinados en un Baño María a 37°C por hora y media.

c) Posteriormente se centrifuga a 2000 rpm por 5 minutos para separar el suero del coágulo.

d) El suero obtenido se deposita en viales estériles con tapón al vacío y se congelan para posterior utilización de la prueba de hemaglutinación pasiva.

Congelación y descongelación del antígeno, para descapsularlo y sensibilizarlo a los eritrocitos.

- 1.- Cultivo de P. multocida tipo D en BHI.
- 2.- Baño María.
- 3.- Congelador.

Este método consiste en congelar el antígeno a 4°C y descongelarlo a 56°C en Baño María, esto se realiza por lo menos 10 veces.

Reactivos para la prueba de hemoaglutinación pasiva.

- 1.- Centrífuga.
- 2.- Baño María.
- 3.- Tubos de Centrífuga.
- 4.- Pipetas de 1 ml (1/10).
- 5.- Pipetas de 10 ml.
- 6.- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 ml.
- 7.- Matraces de 250 y 1000 ml.
- 8.- Potenciómetro.

Solución Alsever (Anticoagulante).

Dextrosa	1 lit
Citrato de Sodio	20.5 g
Acido Citrico	8 g
Cloruro de Sodio	0.5 g
Agua Desionizada	1000 ml

- a) Disolver los constituyentes en agua desionizada en el orden enlistado.
- b) Distribuir el volumen de 100 ml.
- c) Esterilizar por autoclave a 10 lbs por 10 minutos.
- d) Almacenar en refrigeración (26).

Buffer Salino de Fosfato (PBS) 7.2 y 6.4

a) Solución Stock.

a.1) Fosfato disódico monohidrogeno (0.15 M $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$)

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$	3.6 g
Agua Destilada	1000.0 ml

Disolver la sustancia en frascos volumétricos con poca agua y aforar hasta 1000 ml de solución.

a.2) Cloruro de Sodio (0.15 M NaCl).

NaCl	8.5
Agua Destilada	1000.0

Disolver las sustancias en frascos volumétricos con poca agua y aforar hasta 1000 ml de solución.

a.2) Fosfato de Potasio dihidrogenado (0.15 M $\text{KH}_2 \text{PO}_4$).

$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	20.4 g
Agua Destilada	1000.0 ml

Disolver la sustancia en un frasco volumétrico con poca agua y aforar hasta 1000 ml de solución.

b) Buffer de Fosfato Salino (PBS) pH 7.2

$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0.15	24.0 ml
$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$	0.15	76.0 ml
NaCl	0.15	100.0 ml

Mezclar completamente.

c) Buffer de Fosfato Salino (PBS) pH 6.4

Na ₂ HPO ₄	0.15	32.3 ml
KH ₂ PO ₄	0.15	67.7 ml
NaCl	0.15	100.0 ml

Mezclar Completamente

Dilución de Acido Tánico

a) Solución Stock 1:1000

Ac. Tánico 10 mg

Buffer salino de fosfatos 10 ml

b) Solución Ac. Tánico 1:20,000

La solución stock 1:1000 se diluye 1:20 para obtener la dilución 1:20,000 usada en la prueba, ejemplo: 2.0 ml de ácido tánico 1:1000 más 38 ml de PBS pH 7.2.

Tanado de los Glóbulos Rojos

1.- Los glóbulos rojos, suspendidos en solución Alsever, se lavan tres veces con buffer salino pH 7.2, centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos cada vez.

2.- Se mide el paquete y se ajusta a una suspensión de 2.5% agregando 3.9 ml de buffer PBS pH 7.2 por cada 0.1 ml de paquete de eritrocitos.

3.- Se agrega un volumen igual de ácido tánico 1:20,000.

4.- La mezcla se incuba a Baño Maria a 37°C durante 15 minutos.

5.- Centrifugandose a 1,500 rpm durante 5 minutos, se decanta el sobrenadante, resuspendiendo en PBS pH 7.2 y volviendo a centrifugar durante 5 minutos

6.- Se decanta y mide el paquete de glóbulos rojos. Ajustando el volumen a una suspensión de 2.5% con buffer PBS pH 6.4. Se guarda en refrigeración.

Sensibilización de los Glóbulos rojos con el Antígeno Descapsulado

1.- Los glóbulos rojos tanacos se sensibilizan agregando un volumen igual de la dilución óptima de antígeno descapsulado en PBS pH 6.4, agregando 2 ml de la dilución de antígeno a 2 ml de la suspensión de células de 2.5%.

2.- Se incuba la mezcla a Baño María a 37°C durante 15 minutos.

3.- Se retira las células del Baño María y se centrifuga durante 5 minutos a 200 rpm.

4.- Se decanta el sobrenadante y se lava las células otras dos veces por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos con suero normal de conejos diluido al 1% en PBS pH 7.2; volviendo a lavar y centrifugar por 10 minutos para obtener un paquete de glóbulos rojos.

5.- Ajustando el paquete de células a una suspensión de 1.5% en suero normal de conejo diluido en PBS pH 7.2; cada 0.1 de paquete de células se multiplica por un factor que es 66 y se agrega 0.6 ml de suero normal de conejo al 1% obteniéndose una suspensión al 1.5% que son los que se utilizan para la prueba de hemoaglutinación pasiva (21,26).

Prueba de Hemoaglutinación pasiva

1.- Micropipeta de 100 microlitros.

2.- Cajas de microtitulación con fondo en U.

3.- Puntillas Universales.

4.- Sueros Problema.

a) A todas las pozos con fondo en U de las placas de microtitulación, se deposita con la micropipeta 100 microlitros de suero normal de conejo al 1% diluido en buffer PBS 7.2.

b) Se toma la micropipeta con 100 microlitros con el suero problema y colocarlo en la primera poza, mezclando completamente y transfiriendo 100 microlitros a la siguiente poza repitiendo este proceso, lo cual automáticamente no proporciona las siguientes diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256. Los últimos 100 microlitros se desechan.

c) A cada dilución de suero, se agrega 100 microlitros de suspensión de glóbulos rojos al 1.5%. Se deja reposar por 12 horas en refrigeración, para posteriormente realizar la lectura (21,26).

Control de Diluyentes.

Se deposita 100 microlitros de suero normal de conejo al 1%, al cual se agrega Antígeno, Suero, Glóbulos Rojos y Solución buffer PBS 7.2 (Estas deben ser negativas); así como un control positivo y negativo (21).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Afzal M., Muneer R.; Development of combined vaccine for haemorrhagic septicemia and foot and mouth disease: Pak Vet J, 10 (2) 67-69 (1990).
- 2.- Al-Lebban Z. S., Corbell L. B., Coles E. H.; Rabbit Pasteurellosis: Induced and Vaccination. Am J Vet Res, 49 (3) 312-320 (1988)
- 3.- Benson M. L., Thomson R. G., Malli V. E. O.; The Evolution of Vaccine for Bovine Pneumonic Pasteurellosis. Can J Comp Med, 42 368-369 (1964)
- 4.- Boötcher L., Grund S.; Electron microscopic studies on mucosal samples from rabbits after in vitro exposure to Pasteurella multocida subsp. multocida strains. J Vet Med, 37 (7) 520-531 (1990).
- 5.- Buron E. J., Finegold M. S.; Methods for Identification of Etiologic Agents of Infection Disease. Diagnostic Microbiology. Edit. The C. J. Mosby Company 8o. Edition. 422-426 (1990).
- 6.- Broome R. L., Conzelman G. M., Babish J. G., Brooks D. L., Copeland D. D.; Investing the pharmacokinetics of an experimental fluoroquinolone class antimicrobial; Bay Vp 2674, for treatment of pasteurellosis in rabbits. Lao Anim Sc. 37 (4) 532 (1987).
- 7.- Carter G.R.; Enfermedades causadas por Pasteurella y Francisella, Bacteriología y Micología Veterinaria, Primera Edición; Ed. Manual Moderno, p. 201, (1985).
- 8.- Climent J. B.; Teoría y práctica de la explotación del Conejo. Edit. Continental 4a. impresión, pp. 7 (1984)
- 9.- Collins F.M., Miederbuhl C. J., Campbell S.G.; Bacterial Activity of alveolar and peritoneal macrophages in vitro to three strains of Pasteurella multocida. Infect. Immun. 39, 779-784 (1983).
- 10.- Confer A. W., Panciera R. J., Fulton R. W., Gentry J. M., Ramage J. A.; Effect of vaccination with live or killed Pasteurella haemolytica on resistance to experimental bovine. Am Jour Vet Res. 46 (2) 342-347 (1985).

- 11.- Cringoli G., Papparella V.; Researches on the use of Terramycin long acting in respiratory infections of the rabbit. *Acta Medica Veterinaria*, 32 (1/2) 97-108 (1986).
- 12.- Chase W., Williams A. C.; *Methods in Immunology and Immunochemistry* Vol. IV. Ed. Academic Press, Inc. N.Y., U.S.A. (1977).
- 13.- Chengappa M. M., Carter G.R; *Pasteurella and Francisella; Veterinary Bacteriology and Micology*, Edit. LEA & FEBIGER 4o. Edition, 170-175 (1991).
- 14.- Chengappa M. M., Meyers R. C., Carter G. R.; A streptomycin-dependent live *Pasteurella multocida* vaccine for the prevention of rabbit pasteurellosis. *Lab Anim Sci*, 30 S15-S18 (1980).
- 15.- Cho S. K., Park J. L., Kim J. Y., Yoon Y. D.; Studies on the development of a combined vaccine for control of snuffles (*Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* infections) in rabbits. *Res Rep Rural Develop Admon Vet*, 31 (3) 29-37 (1989).
- 16.- Deeb B. J., DiGiacomo R. F., Bernard B. L., Silbernagel S. M.; *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. *J of Cl Microbiol*, 28 (1) 70-75 (1990).
- 17.- DiGiacomo R. F., Jones C. D. R., Wathes C. M.; Transmission of *Pasteurella multocida* in rabbits. *Lab Anim Sci*, 37 (5) 621-623 (1987).
- 18.- DiGiacomo R. F., Deeb B. J., Giddens W. E. Jr., Bernard B. L., Chengappa M. M.; Atrophic rhinitis in New Zealand White infected with *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res*, 50 (9) 1460-1465 (1989).
- 19.- DiGiacomo R. F., Garlinghouse L. E., Van Housier G. L.; Natural History of Infection with *Pasteurella multocida* in rabbits. *J Am Vet med Ass*, 183 (1972) 5 (1983).
- 20.- Dominick M. A., Rimler R. B.; Turbinate osteoporosis in pigs following intranasal inoculation of purified *Pasteurella* toxins: Histomorphometric and ultrastructural studies. *Vet Pathology*, 25 (1) 17-27 (1988).
- 21.- Garza M. V.; Evaluación de Inmunidad en Ovejas contra *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida*, utilizando dos adyuvantes. Tesis Profesional, F.E.S.-C. (U.N.A.M.). 43-48 (1987).

22.- González S. T.; Anteproyecto de una explotación Curicula en la comunidad indígena de Los Reyes Mezontla, Municipio de Zapotitla Salinas, Eco. de Fusbía con proyección de 100 a 500 vientros. Tesis Profesional F.M.V.Z. de la U.N.A.M., 4-10 (1982).

23.- Gringoli G., Papparella V., Mec C., Rossi M., Milani A.; Enroflaxacin in the therapy of experimental infections in rabbits. Paraxis Veterinaria Milano, 11 (1) 24-26 (1990).

24.- Holmes H. T., Fatton N. M., Cheeke P. R.; Pasteurella contaminated watering: Its incidence a implication. J appl rab res 6 (123) 4-5 (1983).

25.- Jastow B. W., Ringeler D. H., Rush H. G., Glorioso J. C.; Pasteurella asociete rhinitis of rabbits: Efficacy of penicilin therapy. Lab Anim Sci, 31 362-385 (1981).

26.- Javier G. A.; Preparación de la solución Aisever. Tesis Profesional "Manual Ilustrado de prácticas de Virologia Veterinaria, F.E.S.-C. (U.N.A.M.), 233 (1988).

27.- Jawetz E., Melnick L. J., Adelberg A. E.; Capitulo 19 Bacilos Gramnegativos pequeños; Microbiología Médica, Edit. Manual Moderno 11a. Edición, 258-259 (1988).

28.- Jones J. M.; An update of rabbit diseases. Part 1: respiratory disaese. NZ Vet J, 36 (2) 66-69 (1988).

29.- Jubb K. V. F., Kennedy P. C.; Pathology of Domestic Animal Vol. II. Academic Press 2o. Edition, 653 (1970).

30.- Kötscha W., Gottschalk C.; Enfermedades del Conejo y la Liebre. Edit. Acribia 2a. Edición, 58-59 (1974).

31.- Lalrinliana F., Sodhi S. S., Baxi k. K., Sambya D. S., Soni G. L.; Efficacy of diferent adjuvants in Pasteurella multocida vaccine. Ind J Vet. 9 (3) 135-140 (1988).

32.- Lelkes C., Corbett M. J.; A preliminary study of the transmission of Pasteurella multocida in rabbits. J appl rab Res. 6 (125) 6-8 (1983).

33.- Loliger H. C., Matthes S.; Infectious diseases of multiple aetiology (Furbearing animals and Farmed rabbits). Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift; 102 (11) 364-371 (1989).

- 34.- Lu Y. S., Pakes S. P.; Protection of rabbits against experimental pasteurellosis streptomycin-dependent Pasteurella multocida serotype 3:A live mutant vaccine. Infect Immun, 34 1016-1024 (1981).
- 35.- Lu Y. S., Pakes S. P., Massey L., Stefanu C.; A potassium thiocyanate extract vaccine prepared from Pasteurella multocida 3:A Protects rabbits against homologous challenge. Infect and Immun, 55 (12) 2967 - 2976 (1987).
- 36.- Manning P. J.; Serology of Pasteurella multocida in Laboratory rabbits: Review. Lab Anim Sci, 32 1-5 (1982).
- 37.- Manual Merk de Veterinaria; Pasteurellosis en conejos. Merk & Co., CENTRUM, Madrid, España, 3a. Edición en Español; 1144-1145 (1988).
- 38.- Martínez R. A., Cruz J. G.; Estudio sobre la respuesta inmune en cerdos inoculados con Haemophilus parahaemolyticus. Tesis Profesional, E.N.E.P.-C. (U.N.A.M.), 31-35 (1980).
- 39.- Morilla A., Bautista C. R.; Hemoaglutinación pasiva o indirecta. Manual de Inmunología. Edit Diana Técnico Primera Edición, 81-89 (1986).
- 40.- Nair M. G., Jayakumar P. M., Nair N. D., Valsaka K. V.; Pathology of Pasteurella pneumonia of rabbits. Ind J Vet, 6 (18) 1 59-64 (1957).
- 41.- Pancietra R. J., Corstvet R. E., Confer A. W., Gresham C. N.; Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of vaccination with live Pasteurella species. Am J Vet Res. 45 (12) 2538-2543, (1984).
- 42.- Papp Z., Rafai P., Elias B., Tuboly S., Molnar E., Jakab L.; Effect of environmental stress factors on the resistance of rabbits to the development of chronic respiratory disease. Magyar Allatorvosok Lapja. 44 (55) 289-292 (1989).
- 43.- Percy D. H., Basin J. L., Rosendal S.; Experimental Pneumonia in Rabbits Inoculated with Strains of Pasteurella multocida. Can J Vet R. 50 36-41 (1985).
- 44.- Pérez M.J. A., Vazquez J. R., Rodríguez M. C., Miranda M. R. E., Nader G. E.; Procedimientos de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinaria U.N.A.M. 2a. Edición. 164-167 (1983).

- 45.- Prácticas de Laboratorio de Inmunología de la F.E.S.-C (U.N.A.M.), Desafío de la Bacterina (1988).
- 46.- Rai R. B.; Dharendra S., Gulyani R., Singh R. N.; Incidence of Pasteurellosis in a commercial rabbitry. *Ind J Vet*, 64 (9) 806-807 (1987).
- 47.- Rai R. B., Singh D., Singh R. N.; Otitis in rabbits etiopathological studies. *Ind J Vet*, 10 (4) 243-244 (1986).
- 48.- Ramirez R. R., Rosales G. F., Rodriguez T. L., Rodriguez G. A.; Daño neumónico provocado por Pasteurella multocida en conejos previamente sensibilizados con bacterina homóloga y su relación con la reacción de Arthus. *Vet Mex*, 21 (2) 149-157 (1990).
- 49.- Resultados Preliminares del XI Censo Nacional de Población; INEGI Gaceta Informativa. Vol. II (3) 7-12. Julio - Septiembre 1990.
- 50.- Rimler R. B., Rhoades K. R.; Serogroup F, a new Capsule serogroup of Pasteurella multocida. *J of Cl Microbiol*, 25 (4) 615-617 (1987).
- 51.- Ringler D. H., Feter G. K., Chrisp C. E., Keren D. F.; Protection of rabbits against experimental pasteurellosis by vaccination with a potassium thiocyanate extract of Pasteurella multocida. *Infect and Immun*, 49 498-504 (1985).
- 52.- Ruiz P. L.; El Conejo. Ediciones Mundi-Frensa 2a. Edición, 164-167 (1983).
- 53.- Rush H. G.; Resistance of some capsular serotype D of Pasteurella multocida to rabbits polymorphonuclear neutrophil phagocytosis. *Vet Microbiol* 20 (1) 72-78 (1989).
- 54.- Scher R. H., Collins G. R., Weisbroth; The establishment of a specific-pathogen-free rabbits breeding. I. Procedures for establishment and maintenance. *Anim Care*, 19 610-616 (1984).
- 55.- Sokkar S. M., Mohamed M. A., Fetaih H.; Pathogenesis of Pasteurella multocida in experimentally infected rabbits. *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin*, 41 (4) 516-521 (1987).
- 56.- Spanoghe L., Okerman L.; Prevention of rabbit pasteurellosis by an inactivated vaccine: field experiments. *Revue de L'Agriculture*. 40 (5) 1283-1293 (1987).

57.- Spanogne L., Okerman L.: Prevention of pasteurellosis in rabbit by vaccination. Cuniculture Paris, 87 169-173 (1969).

58.- Davis D. B., Dulbecco R., Eisen E. H., Ginsber S. H.; Chapter 30 Yersinia, Francisella, Pasteurella and Brucella. Microbiology, Edit. J. B. Lippincott Co. 4o. Edition, 609-613 (1990).

59.- Washington A. J.; Gram-Negative Bacilli. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, Edit. Springer Verlag 2o. Edition, 235-237 (1985).

60.- Watson W. T., Goldsboro J. A., Williams F. P., Sucur R.; Experimental Respiratory Infection with Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica in rabbits. Lab Anim Sci, 25 (459) 64 (1975).

61.- Weisbroth S. H., Scher S.; The establishment specific-pathogen-free rabbit breeding colony. For disease and health statics. Lab Anim Care. 2 (23) 797-799 (1969).

62.- Weich W. D., Lu Y. S., Bawdon R. E.; Pharmacokinetics of Penicillin -G in serum and nasal washing of Pasteurella multocida free and infected rabbits. J appl Rabb Res. 11 (1) 42 (1988).

63.- Urosevic M., Anđjic B., Stark V., Puder H., Mihajlovic Z.; Pathological changes and bacteriological findings in dead rabbits from three intensive farms. Vet Glasnik. 40 (10) 709-714 (1986).

64.- Yuan Z. H., Fung K. F.; Pharmacokinetic of sulfadimidine and its N4-acetyl metacolite in healthy and diseased rabbits infected with Pasteurella multocida. J Vet Pharm and Therapeut, 13 (2) 192-197 (1990).