

01663



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

1  
25

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"Evaluación de la Protección contra la  
Pasteurelosis Neumónica, en Corderos  
Vacunados con Diferentes Antígenos  
de *Pasteurella haemolytica* AI"

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS  
*mesa con presentación*  
presenta

M.V.Z. FRANCISCO AGUILAR ROMERO



ASESORES

M.V.Z. M.Sc. Ph.D. Francisco J. Trigo Tavera  
M.V.Z. M. en C. Ph.D. Francisco Suárez Güemes

México, D.F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bacteriología, como parte de las investigaciones que se llevan a cabo en el proyecto "Complejos Neumónicos de Rumiantes" del Centro Nacional de Investigación en Microbiología Veterinaria INIFAP-SAGAR, en colaboración con la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.**

**ASESORES: M.V.Z. M.Sc. Ph.D. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA**

**M.V.Z. M.en C. Ph.D. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES**

**Trabajo financiado parcialmente por la International Foundation for Science (IFS), de Estocolmo Suecia, Grant No. B/16626-1 y por el Programa de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM**

**DEDICATORIAS:**

**A mi esposa e hijas: TERESA**

**DANIELA MAYARÍ**

**TANIA**

**A mis padres: REGULO AGUILAR R.**

**VICTORIA ROMERO CII.**

**A mi abuelo: SEVERIANO ROMERO C.**

**Que va de la mano con el presente siglo.**

**A mis hermanos y sus respectivas familias: EDMUNDO, NORMA, REGULO,  
JOSÉ LUIS Y BLANCA ESTELA**

**A las familias AGUILAR MAYA y CRUZ BADILLO**

**AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco el apoyo que me brindaron las autoridades del INIFAP-SAGAR, especialmente al los Drs. Dióforo Batalla Campero y Everardo González Padilla.

A los Drs. Francisco Trigo Tavera y Francisco Suárez Güemes, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, por su apoyo incondicional, valiosos consejos , infinita paciencia e insistencia para que esto culminara.

A la QFB Laura Jaramillo Meza por su imprecindible participación en el desarrollo de todo el trabajo, y al MVZ Francisco Morales Alvarez por su desinteresada colaboración.

Al M en C Marcelino E. Rosas García por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

Al C. Rafael Palma García por su apoyo en la fase de campo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Bacteriología en Palo Alto, D.F.

A todos mis compañeros del CENI-Microbiología Veterinaria INIFAP-SAGAR.

**AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco el apoyo que me brindaron las autoridades del INIFAP-SAGAR, especialmente al los Drs. Dióforo Batalla Campero y Everardo González Padilla.

A los Drs. Francisco Trigo Tavera y Francisco Suárez Güemes, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, por su apoyo incondicional, valiosos consejos , infinita paciencia e insistencia para que esto culminara.

A la QFB Laura Jaramillo Meza por su imprecindible participación en el desarrollo de todo el trabajo, y al MVZ Francisco Morales Alvarez por su desinteresada colaboración.

Al M en C Marcelino E. Rosas García por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

Al C. Rafael Palma García por su apoyo en la fase de campo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Bacteriología en Palo Alto, D.F.

A todos mis compañeros del CENI-Microbiología Veterinaria INIFAP-SAGAR.

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	8
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y METODOS. FASE I. EXPERIMENTAL	9
ANIMALES	9
BACTERIAS	9
CEPA VIRAL	9
ANTIGENOS	10
DISEÑO EXPERIMENTAL	10
EXAMEN CLINICO	11
ESTUDIOS SEROLOGICOS	11
ESTUDIO BACTERIOLOGICO	11
EXAMEN HISTOPATOLOGICO	12
EXAMEN MACROSCOPICO DE LESIONES PULMONARES	12
ANALISIS ESTADISTICO	12

<b>PRODUCCION DE ANTIGENO CON BACTERIA VIVA</b>	<b>13</b>
<b>OBTENCION DE EXTRACTO SOLUBLE CAPSULAR</b>	<b>13</b>
<b>PRODUCCION DE LEUCOTOXINA</b>	<b>14</b>
<b>PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE</b>	<b>14</b>
<b>PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA</b>	<b>15</b>
<b>FASE 2 DE CAMPO</b>	
<b>ANIMALES</b>	<b>17</b>
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>17</b>
<b>ESTUDIOS SEROLOGICOS</b>	<b>18</b>
<b>ANALISIS ESTADISTICO</b>	<b>18</b>
<b>RESULTADOS DE LA FASE EXPERIMENTAL.</b>	
<b>TEMPERATURA</b>	<b>19</b>
<b>ANTICUERPOS ANTICAPSULA</b>	<b>19</b>
<b>ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA</b>	<b>20</b>
<b>EVALUACION DEL DAÑO PULMONAR</b>	<b>20</b>
<b>ESTUDIO BACTERIOLOGICO</b>	<b>21</b>

<b>ESTUDIO HISTOLOGICO</b>	<b>21</b>
<b>RESULTADOS DE LA FASE 2 DE CAMPO.</b>	
<b>ANTICUERPOS ANTICAPSULA</b>	<b>22</b>
<b>ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA</b>	<b>22</b>
<b>EVALUACION CLINICA</b>	<b>23</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>49</b>

**LISTA DE CUADROS****PAGINA**

<b>CUADRO 1. ANALISIS DE VARIANZA DE TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA. FASE 1 EXPERIMENTAL</b>	<b>24</b>
<b>CUADRO 1a. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE TUKEY</b>	<b>24</b>
<b>CUADRO 2. ANALISIS DE VARIANZA DE TITULOS DE ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA. FASE 1 EXPERIMENTAL</b>	<b>25</b>
<b>CUADRO 2a. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE TUKEY</b>	<b>25</b>
<b>CUADRO 3. RESULTADO DE ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE ORGANOS. FASE 1 EXPERIMENTAL</b>	<b>26</b>
<b>CUADRO 4. ANALISIS DE VARIANZA DE TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA. FASE 2 DE CAMPO</b>	<b>27</b>
<b>CUADRO 4a. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE TUKEY</b>	<b>27</b>
<b>CUADRO 5. ANALISIS DE VARIANZA DE TITULOS DE ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA. FASE 2 DE CAMPO</b>	<b>28</b>
<b>CUADRO 5a. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE TUKEY</b>	<b>28</b>

## LISTA DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. TEMPERATURA RECTAL DE CORDEROS INMUNIZADOS CON <i>P. haemolytica</i>	29
FIGURA 2. ANTICUERPOS ANTICAPSULA EN CORDEROS CON LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA	30
FIGURA 3. ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA EN CORDEROS CON LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE	31
FIGURA 4. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO A TRATADOS CON BACTERIA VIVA	32
FIGURA 5. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO B USADOS COMO TESTIGO	33
FIGURA 6. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO C TRATADOS CON BACTERINA COMERCIAL	34
FIGURA 7. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO D TRATADOS CON LEUCOTOXINA	35
FIGURA 8. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO E TRATADOS CON ESC+ LEUCOTOXINA	36
FIGURA 9. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO F TRATADOS CON ESC+ LEUC+ ADY	37
FIGURA 10. ANTICUERPOS ANTICAPSULA EN CORDEROS VACUNADOS CON ANTIGENO DE <i>P. haemolytica</i>	38
FIGURA 11. ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA EN CORDEROS VACUNADOS CON <i>P. haemolytica</i>	39
FIGURA 12. CORDEROS QUE PRESENTARON PROBLEMAS RESPIRATORIOS	40

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA, EN CORDEROS VACUNADOS CON DIFERENTES ANTÍGENOS DE *Pasteurella haemolytica* A1.

RESUMEN.

Con la finalidad de medir la protección contra la pasteurelosis pulmonar que generan diferentes inmunógenos de *Pasteurella haemolytica* A1, se procedió a evaluarlos en 2 etapas; primero en condiciones experimentales y posteriormente en campo. Para la primera etapa, se utilizaron 42 corderos distribuidos en forma aleatoria en 6 grupos. En el día 0 del experimento el grupo A recibió como inmunógeno por vía subcutánea, un cultivo vivo en fase de crecimiento logarítmico de *P. haemolytica* a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml, el B sirvió como testigo, al C se le administró una bacteria comercial, el D fue tratado con sobrenadante de cultivo (leucotoxina), al E se le administró extracto soluble capsular (ESC) con leucotoxina y el F fue tratado con ESC con leucotoxina y adyuvante. Los animales fueron expuestos en el día 35 al virus de parainfluenza 3 (PI<sub>3</sub>) por vía intratraqueal e intranasal y siete días después fueron desafiados con una cepa de campo de *P. haemolytica* por vía transtorácica. Los corderos que sobrevivieron al desafío fueron sacrificados al día 49 del experimento, para el registro de lesiones a nivel pulmonar y realizar estudio bacteriológico de diversos órganos. A los animales se les tomó diariamente la temperatura por vía rectal. Se tomaron muestras de suero en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 41 y 49 del experimento, para la determinación de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina de *P. haemolytica*, empleando las técnicas de hemaglutinación indirecta y ensayo visual simple, respectivamente.

La evaluación de campo se efectuó en 12 explotaciones del poblado de Coajomulco, Morelos, en donde se trabajó con 320 corderos formando 4 grupos de 80 cada uno, aplicando de igual forma que en la fase anterior, con respecto a dosis y vía, los siguientes tratamientos: al grupo 1 se le suministró leucotoxina; el grupo 2 fue tratado con una bacteria comercial; el 3 sirvió como testigo y el 4 recibió bacteria viva. En esta fase el desafío fue natural y se evaluaron niveles de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina, además de registrarse parámetros de morbilidad y mortalidad.

En la fase experimental los títulos de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en los grupos tratados con bacteria viva, leucotoxina y bacteria comercial en comparación con el resto de los grupos; por otro lado las lesiones fueron más severas en los grupos B, E y F.

En la fase de campo los resultados mostraron que en los grupos 1, 2 y 4 se enfermaron de neumonía clínica 3 animales (3.75%), 5 (6.25%) y 4 (5%) respectivamente y en el grupo 3 (testigo) fueron 23 (28.75%). Con respecto a la mortalidad y los niveles de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina se encontró diferencia ( $p < 0.05$ ) entre los grupos 1 y 3. Los resultados obtenidos en ambas fases sugieren que la leucotoxina y la bacteria viva pueden ser una opción importante en la prevención de neumonías, debiéndose continuar con la investigación de los diferentes inmunógenos utilizados, así como buscar nuevas opciones.

Palabras clave: *Pasteurella haemolytica*, neumonía, corderos, inmunógenos, protección.

**SUMMARY**  
**EVALUATION OF THE PROTECTION AGAINST PNEUMONIC PASTEURILLOSIS IN LAMBS VACCINATED WITH DIFFERENT ANTIGENS OF *Pasteurella haemolytica* A1.**

To measure the protection against pneumonic pasteurellosis provided by different immunogens of *Pasteurella haemolytica* A1 an evaluation in two stages was conducted. First under experimental conditions and afterwards on field trials.

In the first stage it used 42 lambs randomly in six groups were used. On day 0 of the experiment, group A received subcutaneously as an immunogen a live culture in the logarithmic phase of *P. haemolytica* with a  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Group B was a control group. Group C received a commercial bacterin. Group D was treated with leukotoxin culture supernatant. Group E was inoculated with a soluble capsule extract (SCE) with leukotoxin. Finally the group F was treated with SCE with leukotoxin plus adjuvant. All animals were exposed on day 35 to the Parainfluenza virus type 3 (PI<sub>3</sub>) intratracheally and intranasally and seven days later challenged with a field strain of *P. haemolytica* transthoracically. The surviving sheep were sacrificed at day 49 of the experiment to assess the pulmonary lesions and to perform the bacteriological study of some organs. Each animal had rectal temperature measured daily, and serum samples were taken on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 41 and 49 of experiment to determine the anticapsule and antileukotoxin antibody levels, using indirect hemagglutination and simple visual assay.

The field evaluation was carried out on 12 farms in Coajomulco, Morelos, where working with 320 lambs divided into 4 groups of 80 individuals each. Using the same method as above with respect to the dosage and administration technique we proceeded as follows: Group 1 received leukotoxin, group 2 was treated with a commercial bacterin, group 3 was used as control, and group 4 received a live bacteria. In this phase the challenge was natural and evaluated anticapsule and antileukotoxin antibodies titers besides registering morbidity and mortality.

In the experimental phase the measurements of the levels of anticapsule and antileukotoxin antibodies were statistically higher ( $p < 0.05$ ) in the groups treated with live bacteria, leukotoxin and commercial bacterin as compared to the rest of groups. On the other hand, the lesions found were more severe in groups B, E, and F.

In the field trial, group 1 had 3 (3.75%) animals which developed clinical pneumonia, while group 2 had 5 (6.25%) and group 4 had 4 (5%) animals; control group 3 had 23 lambs (28.75%) with clinical pneumonia. Group 1 had fewer deaths and higher anticapsule and antileukotoxin antibody titers than the control group 3 ( $p < 0.05$ ). The results obtained in both phases suggest that the leukotoxin and the live bacteria are an important option in the prevention of pneumonia, and that research must continue on the different immunogens used, as well as searching for new options.

**Key words:** *Pasteurella haemolytica*, pneumonia, lambs, immunogens, vaccination, protection.

## INTRODUCCIÓN

*Pasteurella haemolytica* (*P. haemolytica*) es una bacteria de forma cocobacilar que mide aproximadamente 1.4 por 0.4 micras, es Gram negativa con tinción bipolar, inmóvil, no forma esporas, posee cápsula, oxidasa positiva, aerobia y anaerobia facultativa, no fermenta la lactosa, no produce gas, no licúa la gelatina, no coagula la leche, en agar sangre produce hemólisis beta y presenta dos biotipos, el A y el T debido a que algunas cepas fermentan a los carbohidratos Arabinosa y Trehalosa respectivamente. Dentro de éstos biotipos existen diferencias antigénicas de acuerdo a sus antígenos capsulares solubles por lo que se reconocen 16 serotipos de los cuales los números 3, 4, 10 y 15 pertenecen al biotipo T y son causantes de la pasteurelosis septicémica en ovinos, mientras que los restantes son del biotipo A siendo los serotipos 1 y 2 los mas frecuentemente aislados de muestras clínicas de corderos y borregos adultos con problemas neumónicos<sup>1</sup>.

En los últimos años se ha discutido acerca de la organización del grupo *Pasteurella*. Se ha observado en estudios como los de homología de ADN/ADN, comparación de las secuencias de la subunidad 16 S ARNr, inmunoelectroforesis y características biológicas de las bacterias que actualmente integran este género, existen diferencias como para sugerir una nueva clasificación<sup>4,60</sup>. Por ejemplo, al estudiarse la distribución de 6 genes de *P. haemolytica* en los 16 serotipos, se encontró que en los biotipos A y T, la organización de algunos de éstos es diferente y en otros casos los genes no están presentes, como en el biotipo T. De acuerdo a lo anterior se ha observado que dentro los biotipos A y T existen suficientes diferencias, tanto biológicas como inmunológicas y genéticas para suponer que se trata de dos especies, sugiriendo el nombre de *P. trehalosi* para la biovariedad T<sup>38</sup>.

*P. haemolytica* se considera como un importante oportunista del tracto respiratorio de los bovinos, ovinos y cabras, ya que usualmente coloniza la parte alta de éste, y bajo ciertas condiciones de inmunosupresión en el huésped, tales como primoinfección por virus o micoplasmas, cambios de temperatura, humedad, ventilación deficiente, afecta los mecanismos de defensa que permite el establecimiento del microorganismo y daño al tejido pulmonar<sup>1, 25,26,37,41,64,67</sup>.

*P. haemolytica* presenta diversos factores asociados con su virulencia tales como la presencia de glicocálix, fimbria<sup>48</sup> y endotoxina<sup>32</sup>, además de la producción de una exotoxina que ha demostrado ser tóxica para los macrófagos alveolares y linfocitos de rumiantes. Los macrófagos alveolares se consideran como la primera defensa a nivel pulmonar contra el establecimiento y desarrollo de infecciones pulmonares. Con la muerte de éstas células también se liberan enzimas proteolíticas, histamina y otros mediadores químicos del proceso inflamatorio que contribuyen al daño pulmonar, por lo tanto se ha considerado a la leucotoxina producida por cada uno de los 16 serotipos de *P. haemolytica* como el principal factor de virulencia de la bacteria<sup>2,41,58</sup>. Al realizar un análisis en los serotipos 3 y 11 de secuencias de nucleótidos de los genes *lktC* y *lktA* que codifican para la producción de éstas leucotoxinas se encontró que existen sustituciones de nucleótidos en todo el código de secuencias, aunque éstas exotoxinas están estrechamente relacionadas desde el punto de vista inmunológico, funcional y genético. También se encontró que un mínimo de 7 variantes de genes *lkt* están presentes en *P. haemolytica* y esto puede ser determinado desde el punto de vista clínico<sup>7</sup>. Esta sustancia es producida durante la fase logarítmica de crecimiento, es soluble en agua, es antigénica, consta principalmente de dos fracciones; una proteica y un carbohidrato, tiene un peso molecular de alrededor de 150,000 daltones al analizarla por

cromatografía de filtración en gel<sup>31</sup>; Chang *et al* (1987) encontraron en la toxina un polipéptido simple como componente principal con un peso molecular de 105,000 daltones al analizarlo por SDS-PAGE<sup>18</sup>, su actividad leucotóxica óptima es a 37°C y se inhibe a 4°C, es estable a pH de 2 a 12 y resistente al calor hasta 60°C<sup>31,49,57</sup>. Se ha observado que en condiciones *in vitro* se produce leucotoxina altamente agregada encontrándose moléculas de hasta 8000 kDa, que al aplicarles guanidina 3M sufrió una disgregación parcial y aumentó la actividad leucotóxica y detectándose moléculas más pequeñas de peso molecular de 800 kDa; entendiendo este proceso de disgregación y el incremento de su actividad podría ser relevante en el medio ambiente pulmonar *in situ*, en el cual *P. haemolytica* desarrolla la infección<sup>8</sup>. El crecimiento de ésta bacteria en medios de cultivo conteniendo suero, se ha asociado a un incremento en la actividad leucotóxica<sup>10</sup>, encontrándose similitudes en las concentraciones de albúmina sérica bovina, disgregación y actividad leucotóxica con las observadas en infecciones experimentales<sup>68,69</sup>. Otros factores pulmonares como el surfactante, pueden actuar disgregando y aumentando la actividad leucotóxica, incrementándose la virulencia<sup>8</sup>. Conlon *et al* (1992) demostró que la leucotoxina induce a la agregación de neutrófilos y que esta activación puede contribuir al proceso de inflamación intensa que se observa en los casos de neumonía<sup>15</sup>.

Las vacunas contra pasteurelisis en ovinos, han sido usadas por décadas, pero su eficacia sigue siendo cuestionada. Actualmente se han desarrollado diversos inmunógenos para prevenir las neumonías en rumiantes por *Pasteurella haemolytica* con resultados aparentemente satisfactorios, en algunos casos, utilizando como antígenos: bacteria viva, bacteria muerta, material capsular, extractos bacterianos y leucotoxina cruda<sup>13,17,20,23,35,55,58,61</sup>.

Las investigaciones recientes sobre neumonías de los ovinos están orientadas a la identificación de 3 principales factores de virulencia que podrían ser utilizados potencialmente como inmunógenos protectivos, éstos son: las proteínas reguladas por hierro (PRH), leucotoxina y material capsular. En la caracterización inicial de las proteínas (PRE) localizadas en la membrana externa y el espacio periplásmico identificaron proteínas con pesos moleculares de 35, 70, y 100 kDa; exámenes posteriores revelaron que la proteína de 70 kDa era una mezcla de 3 distintas proteínas. Anticuerpos a las PRH han sido detectados en el suero y fluidos pulmonares de animales que enfermaron y se recuperaron de pastereiosis. También se ha observado que las PRH incrementan significativamente la eficacia protectora de extractos libres de bacterias y/o bacterinas contra desafíos experimentales<sup>17</sup>. Con respecto al sobrenadante concentrado del serotipo A1 conteniendo leucotoxina con lipopolisacárido y material capsular confirieron protección a corderos libres de patógenos específicos (SPF) desafiados con serotipos A1 y A2<sup>22</sup>.

La leucotoxina ha mostrado ser antigénica y se ha utilizado como inmunógeno experimental en la prevención de la pastereiosis pulmonar tanto en ovinos<sup>61</sup> como en bovinos<sup>58</sup>. Existe información que indica que hay una correlación directa entre títulos de anticuerpos neutralizantes de la leucotoxina con la resistencia a la enfermedad<sup>24,49</sup>.

Por otro lado en trabajos experimentales al utilizar a la bacteria viva como inmunógeno, se observó que los animales tratados desarrollaron anticuerpos a varios antígenos incluyendo componentes de la pared celular, cápsula y leucotoxina. Lo anterior se explica por el hecho de que las bacterias vivas al reproducirse, permiten la producción y liberación de la leucotoxina y su reconocimiento como un antígeno.<sup>14,45</sup>

Es importante señalar que se ha demostrado que *P. haemolytica* expresa antígenos diferentes en condiciones *in vivo* e *in vitro* ya que al obtener bacterias serotipo A2 directamente de fluido pleural de ovinos con pasteurelisis neumónica y analizarlas por corrientes electroforéticas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se expresaron proteínas de alto peso molecular (70 kDa) que no fueron encontradas cuando las bacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo<sup>14</sup>. En otro trabajo, al estudiar la variabilidad antigénica existente en una cepa del serotipo A1 cultivada bajo diferentes condiciones, se encontró que la bacteria que fue inoculada en el tejido subcutáneo de becerros mostró proteínas de peso molecular de 150 kDa, a diferencia de cuando la bacteria fue cultivada en medio sólido y líquido se encontraron proteínas de 30, 42, 55, 71 y 100 kDa. Sin embargo las proteínas encontradas en las bacterias cultivadas en el inóculo subcutáneo fueron reconocidas por sueros de becerros que fueron resistentes al desafío con bacterias vivas y que habían sido inmunizados con 2 diferentes vacunas: con bacterias formalinizadas o bacterias cultivadas en medio sólido, lo que indica que los antígenos de alto peso molecular de las bacterias obtenidas del implante subcutáneo pueden ser precursores de determinantes antigénicos de otras proteínas de *P. haemolytica*<sup>11</sup>.

El uso de bacterinas como medida preventiva ha mostrado que los animales bacterinizados desarrollan neumonías más severas, debido a que éste inmunógeno induce una respuesta dirigida contra los antígenos de superficie que facilitan su fagocitosis por el macrófago alveolar, el cual muere y libera enzimas proteolíticas y mediadores que dañan el tejido pulmonar<sup>15,17</sup>. En México se encuentran disponibles en el mercado 12 bacterinas comerciales para prevenir la pasteurelisis neumónica producida por *P. haemolytica* en rumiantes<sup>18</sup>.

Existen numerosos informes sobre la frecuencia de neumonías en ovinos producidas por *P. haemolytica*, tanto a nivel internacional como nacional y se ha encontrado como una de las principales causas de mortalidad perinatal con índices que varían de acuerdo con la procedencia, tipo de explotación, época del año, con cifras que fluctúan del 10% al 40%<sup>30,33,36,40,52,64</sup>. En México, Hernández<sup>29</sup> encontró que en Centro Ovino del programa de Extensión Agropecuaria (COPEA) ubicado en Topilejo D.F. fue del 20%, mientras que Trigo y Romero<sup>65</sup> encontraron lesiones neumónicas en 24% de los corderos que revisaron. Por otro lado, Montes de Oca<sup>66</sup> encontró una mortalidad del 40% en corderos del Valle de Toluca.

En nuestro país, la población de ovinos en la última década ha sufrido un decremento; en 1981 se tenían registrados 6,097,000 cabezas y en 1988 se redujo a 5,761,000 debido a el costo de producción y a las importaciones. Por ejemplo, en 1988 se consumieron 39,400 toneladas de carne y solamente se produjeron en el país 23,800, teniéndose que importar la diferencia además de que los precios del producto se redujeron, ya que en 1981 el kilogramo en canal y en pie era de 9,148 (N\$ 9.14) y 4,434 (N\$4.43) pesos respectivamente; y en 1988 bajó a 7,839 (N\$7.83) y 3,904 (N\$ 3.9); contrastando con los incrementos en los costos como: alimentación, programas de prevención en salud y mano de obra. Lo anterior ha provocado un proceso de descapitalización e inhibición de la inversión; aunado a esto, se le debe agregar la baja productividad debido a una serie de deficiencias en la organización de productores, financiamiento, industrialización, comercialización, programas de asistencia técnica y falta de vinculación de la investigación con los productores, programas de sanidad, genética y nutrición<sup>44</sup>.

Ante esta problemática, el Programa de Modernización del Campo planteó como metas para 1994 el reducir las importaciones en 5%, reducir en 60% las pérdidas ocasionadas por enfermedades, incrementar la producción a 28,000 toneladas y el inventario a 6.6 millones de cabezas, promover 100 grupos de Intercambio tecnológico en el sector social, apoyo con programas de genética y reproducción, organización de productores, financiamiento, industrialización y comercialización. En estadísticas de la Dirección General de Información Agropecuaria, Forestal y de Fauna Silvestre de la SAGAR se informa que en 1993 se produjeron a nivel nacional 62,421 toneladas de carne en pie de ovino<sup>44</sup>. Por lo anteriormente expuesto, se considera importante realizar estudios que puedan generar productos (en este caso un biológico), que permitan incrementar la productividad en este sector pecuario.

## **HIPÓTESIS.**

Los ovinos inmunizados con biológicos compuestos de leucotoxina, bacteria viva y extractos solubles de *Pasteurella haemolytica* A-1 estarán protegidos contra la pasteurelosis neumónica, en comparación con animales no inoculados o que reciben bacterina comercial.

## **OBJETIVOS.**

1). Producir y evaluar biológicos experimentales con exotoxina, componentes capsulares y células completas de *P. haemolytica* que sean capaces de proteger a los animales vacunados al exponerlos al desafío experimental.

2). Medir los niveles de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina de los animales vacunados y determinar si existe una relación directa entre títulos de anticuerpos y protección al desafío experimental.

3). Evaluar el comportamiento de los biológicos en condiciones de campo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

La evaluación de la protección que confieren los inmunógenos se realizó por medio de un estudio experimental longitudinal prospectivo<sup>56,61</sup> y se llevó a cabo en dos fases, la primera en condiciones experimentales y la segunda en condiciones de campo.

### **FASE I. FASE EXPERIMENTAL.**

#### **ANIMALES.**

Se utilizaron 42 ovinos de 2 a 4 meses de edad, clínicamente sanos, que fueron distribuidos en forma aleatoria en 6 grupos de 7 animales cada uno. A cada grupo se le denominó con las siguientes letras A, B, C, D, E y F, y fueron confinados en los corrales del Centro Nacional de Investigación en Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias-SAGAR.

#### **BACTERIAS.**

Se utilizaron dos cepas de *P. haemolytica* A-1, una de ellas de referencia\*, fue utilizada para producir los antígenos y la otra que fue empleada como cepa de desafío, se aisló de un caso clínico de pasteurelosis pulmonar ovina.

#### **CEPA VIRAL.**

La cepa de virus de Parainfluenza 3 (PI<sub>3</sub>) que se utilizó en la exposición fue aislada en México a partir de un pulmón de ovino, replicada en cultivos celulares y mantenida en congelación hasta su utilización en donde fue titulada a una concentración de  $1 \times 10^6$  Dosis Infectante 50 de Cultivo de Tejido por mililitro (DICT<sub>50</sub>/ml).

\*donada por el Dr. G. Frank del laboratorio Animal Disease Center de Ames, Iowa, USA.

## **ANTÍGENOS.**

Se utilizaron cuatro antígenos de *P. haemolytica* que fueron, leucotoxina cruda (proteína en sobrenadante de cultivo), extracto soluble capsular, cultivo en fase de crecimiento logarítmico (suspensión de células vivas incubadas 6 horas) y bacteria comercial (suspensión de células completas inactivadas). La producción de leucotoxina se realizó de acuerdo al método recomendado por Gentry<sup>28</sup>. La obtención del extracto soluble capsular se realizó siguiendo la técnica descrita por Durkhan<sup>29</sup>. El cultivo fresco de *P. haemolytica* en fase logarítmica de crecimiento a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml se obtuvo siguiendo la metodología de Confer<sup>13</sup>. Los procesos de producción y pruebas serológicas se describen a continuación.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL.**

Los antígenos se aplicaron en el día 0 del experimento de acuerdo al siguiente esquema:

**Grupo A:** Suspensión de cultivo fresco de *P. haemolytica* a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml, por vía subcutánea.

**Grupo B:** Testigo (recibió solución salina fisiológica)

**Grupo C:** Bacteria comercial

**Grupo D:** Leucotoxina cruda a una concentración de 10 mg/ml, 2 ml vía subcutánea.

**Grupo E:** Extracto soluble 2.5 mg/ml (1ml) + Leucotoxina cruda.

**Grupo F:** Leucotoxina + Extracto soluble + adyuvante.

Al día 35 los corderos fueron expuestos al virus de PI<sub>3</sub> por vía intratraqueal e intranasal con una suspensión titulada a  $1 \times 10^6$  DICT<sub>50</sub>/ml, la cual se define como la cantidad de virus contenido en 50  $\mu$ l que causa el 50% de efecto citopático en cultivo de tejidos.

En el día 42 del experimento se efectuó el desafío con *P. haemolytica*, utilizando una cepa de campo aislada de un caso de neumonía en ovino, con una suspensión de  $1 \times 10^9$  UFC/ml por vía transtorácica utilizando un volumen de 2 ml. Los animales que sobrevivieron al desafío experimental fueron sacrificados el día 49 y se les practicó la necropsia para registrar lesiones pulmonares macroscópicas y coleccionar muestras de tejido de diferentes órganos para el estudio bacteriológico.

#### **EXAMEN CLÍNICO.**

Se registró la temperatura corporal de todos los corderos por vía rectal diariamente por la mañana, durante todo el experimento, así como su estado clínico general.

#### **ESTUDIOS SEROLÓGICOS.**

Se obtuvo un sangrado basal previo a la inoculación de los antígenos y posteriormente los animales fueron sangrados los días 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 del experimento, para las pruebas serológicas. Se utilizó la técnica de Hemoaglutinación Indirecta (HI) para la determinación de los anticuerpos anticápsula y la del Ensayo Visual Simple (EVS) para medir los niveles de anticuerpos antileucotoxina, ambas descritas por Biberstein<sup>3</sup> y Gentry<sup>28</sup>, respectivamente.

#### **ESTUDIO BACTERIOLÓGICO.**

Se recolectaron muestras de pulmón, hígado, riñón y bazo en condiciones asépticas durante las necropsias, para intentar recuperar la cepa de desafío o alguna otra bacteria que se encontrara involucrada en el proceso septicémico. El aislamiento e identificación de los microorganismos se efectuó por los métodos rutinarios<sup>16</sup>.

### **EXAMEN HISTOPATOLÓGICO.**

Se tomaron muestras de las lesiones pulmonares, las cuales fueron fijadas en formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina, para ser procesadas y teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina y posteriormente examinadas al microscopio<sup>59</sup>.

### **EXAMEN MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES PULMONARES.**

Las lesiones pulmonares macroscópicas que se observaron durante las necropsias, fueron registradas en esquemas iguales para todos los casos y que representaban los pulmones mediante el llenado de áreas similares a las observadas, con la finalidad de realizar una comparación del tamaño de lesiones entre los diferentes grupos de animales.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El estudio estadístico que se utilizó para las variables niveles de anticuerpos anticápsula, antileucotoxina y temperatura fue un análisis de varianza con un diseño en arreglo factorial anidado con rompimiento en tiempo. Los títulos serológicos se expresan logaritmicamente en base 2 para facilitar la interpretación de los datos y análisis<sup>63</sup>. Finalmente se realizó la comparación de las medias con la prueba de significancia de Tukey<sup>69,54</sup>.

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + A(i)j + D_k + TD_{ik} + e(i)jkl$$

donde:

$ijkl$  = es la  $i$ -ésima observación asociada al  $K$ -ésimo tiempo de muestreo, al  $j$ -ésimo animal dentro de tratamiento y al  $i$ -ésimo tratamiento.

$\mu$  = Media de la población.

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$A(i)j$  = Efecto del  $j$ -ésimo animal anidado en el  $i$ -ésimo tratamiento.

D<sub>k</sub>= Efecto del k-ésimo tiempo de medición o muestreo.

TD<sub>ik</sub>= Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento con el K-ésimo tiempo de medición.

e(i)jkl= error aleatorio.

#### PRODUCCIÓN DE ANTIGENO CON BACTERIA VIVA DE *Pasteurella haemolytica*.

El cultivo de *Pasteurella haemolytica* para elaborar la vacuna viva y el inóculo de desafío se obtuvo de la siguiente forma: las cepas fueron cultivadas en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) suplementado con 0.5% de extracto de levadura, 10% de sangre de bovino y 5% de suero de equino. Se incubaron durante 6 horas a 37°C y se procedió a cosechar las células en solución salina amortiguada con fosfatos (PBSS, 0.01 M, pH 7.4), llevándose a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml<sup>13</sup>.

#### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SOLUBLE CAPSULAR.

El Extracto Soluble Capsular (ESC) extraído con Salicilato de Sodio fue preparado de la siguiente forma: se preparó un inóculo inicial de *Pasteurella haemolytica* que fue cultivada en Caldo BHI a 37°C durante 18 horas. De éste cultivo se tomaron 5 ml para inocular matraces de 500 ml de caldo BHI que fueron incubados durante 6 horas a 37°C con agitación. Posteriormente se centrifugaron a 12, 000 g durante 30 minutos a 4°C y el paquete celular fue resuspendido en 50 ml de Salicilato de Sodio 1.0 M. La mezcla fue incubada durante 3 horas a 37°C y posteriormente centrifugada a 28, 000 g durante 40 minutos a 4°C. El sobrenadante constituyó el extracto, el cual fue concentrado por diálisis y almacenado en congelación (-20°C) hasta su uso<sup>23</sup>.

#### PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica*.

Se cultivó *Pasteurella haemolytica* durante 6 horas a 37°C en Agar Sangre, suplementado con 0.5% de extracto de levadura y 5% de suero de equino. Las bacterias fueron cosechadas para producir un inóculo al 10%, el paquete celular fue resuspendido en medio RPMI, suplementado con suero fetal de ternero al 7%. Se incubó en baño maría con agitación continua a 37°C durante 5 horas. Se centrifugó a 6,000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se esterilizó por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ , se fraccionó en viales de 5 ml y se liofilizó; posteriormente se almacenó a -20°C. La leucotoxina se tituló mediante la prueba de Ensayo Visual Simple<sup>26,57</sup>.

#### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE.

La prueba se realizó en microplacas de 96 pozos con fondo plano. Los sueros a probar fueron inactivados en baño maría a 56°C por 30 minutos. Se realizaron diluciones dobles de los sueros directamente en las placas, para lo cual se agregaron 50  $\mu$ l de PBS en cada pozo. Se agregaron 50  $\mu$ l de cada suero a probar en cada uno de los pozos de la fila A y se hicieron las diluciones con un microdilutor de 50  $\mu$ l. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de leucotoxina previamente reconstituida. Se le adicionaron 100  $\mu$ l de una suspensión de leucocitos de bovino en medio RPMI ajustada a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por microlitro. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C, y se centrifugaron durante 10 minutos a 2,000 g. Se decantó el sobrenadante por inversión rápida de la placa. Se colocaron 100  $\mu$ l de formalina amortiguada al 10% en cada pozo y se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se les agregó cristal violeta al 1% en solución acuosa y se dejó que actuara durante 5 minutos. Las placas se lavaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente, para después realizar la lectura.

#### **PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica*.**

Se cultivó *Pasteurella haemolytica* durante 6 horas a 37°C en Agar Sangre, suplementado con 0.5% de extracto de levadura y 5% de suero de equino. Las bacterias fueron cosechadas para producir un inóculo al 10%, el paquete celular fue resuspendido en medio RPMI, suplementado con suero fetal de ternero al 7%. Se incubó en baño maría con agitación continua a 37°C durante 5 horas. Se centrifugó a 6,000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se esterilizó por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ , se fraccionó en viales de 5 ml y se liofilizó; posteriormente se almacenó a -20°C. La leucotoxina se tituló mediante la prueba de Ensayo Visual Simple<sup>28,57</sup>.

#### **PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE.**

La prueba se realizó en microplacas de 96 pozos con fondo plano. Los sueros a probar fueron inactivados en baño maría a 56°C por 30 minutos. Se realizaron diluciones dobles de los sueros directamente en las placas, para lo cual se agregaron 50  $\mu$ l de PBS en cada pozo. Se agregaron 50  $\mu$ l de cada suero a probar en cada uno de los pozos de la fila A y se hicieron las diluciones con un micradilutor de 50  $\mu$ l. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de leucotoxina previamente reconstituida. Se le adicionaron 100  $\mu$ l de una suspensión de leucocitos de bovino en medio RPMI ajustada a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por microlitro. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C, y se centrifugaron durante 10 minutos a 2,000 g. Se decantó el sobrenadante por inversión rápida de la placa. Se colocaron 100  $\mu$ l de formalina amortiguada al 10% en cada pozo y se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se les agregó cristal violeta al 1% en solución acuosa y se dejó que actuara durante 5 minutos. Las placas se lavaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente, para después realizar la lectura.

Un fondo azul del pozo indica que la integridad de los leucocitos no fue alterada, los cuales absorbieron el colorante, debido a que la toxina fue neutralizada por los anticuerpos presentes en el suero, por otro lado la ausencia de anticuerpos neutralizantes deja activa a la leucotoxina, la cual ejerció su efecto citopático sobre los leucocitos. El título de anticuerpos neutralizantes en el suero se determinó por la última dilución donde se presenta un fondo azul<sup>28</sup>.

#### PRUEBA DE HEMOAGLUTINACIÓN INDIRECTA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTICÁPSULA DE *Pasteurella haemolytica*.

Eritrocitos de bovino fueron sensibilizados con un antígeno capsular de *Pasteurella haemolytica*, el cual se produjo en frascos de 50 ml con Caldo Infusión Cerebro Corazón que se inocularon e incubaron durante 18 horas a 37°C en baño maría con agitación continua. Posteriormente los cultivos fueron inactivados a 56°C por 30 minutos en baño maría. Una vez que los cultivos se enfriaron se les agregó 0.5 ml de paquete de glóbulos rojos de bovino y se incubaron nuevamente a 37°C durante 1 hora en baño maría, para después centrifugarse a 3,000 g durante 10 minutos y decantar el sobrenadante, repitiéndose la operación. Los glóbulos rojos sensibilizados se suspendieron en un volumen final de 100 ml en PBS (pH 7.2) a una concentración de 0.5%.

Los sueros a probar se inactivaron a 56°C por 30 minutos y fueron diluidos 1:2 con PBS 0.0015M pH 7.2. La prueba se realizó en microplacas de 96 pozos con fondo en "U", y en cada uno de los 96 pozos se colocaron 25 µl de diluyente PBS.

En cada pozo de la línea A de la placa se colocaron 25 µl de cada uno de los sueros; posteriormente se realizaron diluciones dobles con un microdilutor hasta la

**dilución 1:512. A todos los pozos se les agregó una gota de suspensión de eritrocitos sensibilizados al 0.5%. Después de incubar a 4°C durante 24 horas se efectuó la lectura, observando hasta que dilución había hemoaglutinación y así determinar el título del suero<sup>3</sup>. La concentración de anticuerpos se expresa en forma de título; éste es la dilución más alta del suero que produce hemoaglutinación<sup>63</sup>.**

## **FASE 2. FASE DE CAMPO. Ver Fase 1.**

**ANIMALES:** Se utilizaron 320 corderos entre 2 a 4 meses de edad, de 12 explotaciones ovinas del poblado de Coajomulco en el estado de Morelos. El tamaño de la muestra se calculó con la fórmula para detectar diferencias entre promedios<sup>43,51,56</sup>:

$$n = [(Z_{\alpha} + Z_{\beta}) \times DE / d]^2$$

De acuerdo a los resultados obtenidos en la fase experimental del estudio, usando como criterio los niveles de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina, además del tamaño de lesión que se registraron en cada grupo, se eligieron los siguientes 3 antígenos para ser probados en condiciones de campo: bacteria viva, leucotoxina, y la bacterina comercial.

### **DISEÑO EXPERIMENTAL.**

De acuerdo al tamaño de muestra calculado se formaron aleatoriamente 4 grupos, de 80 corderos cada uno, a los cuales se les aplicó de igual forma que en la fase experimental, con respecto a dosis y vía, el siguiente tratamiento:

**Grupo 1:** Se le administró leucotoxina.

**Grupo 2:** Se le administró la bacterina comercial.

**Grupo 3:** Sirvió como testigo y recibió solución salina fisiológica.

**Grupo 4:** Fue inoculado con bacteria viva.

Los animales fueron sangrados al momento de aplicarles el tratamiento y posteriormente en 2 ocasiones con intervalo de aproximadamente un mes; durante ese tiempo se registraron parámetros de morbilidad y mortalidad, relacionados con problemas del tracto respiratorio.

Todos los grupos continuaron con las prácticas rutinarias de manejo y alimentación durante todo el experimento que duró 2 meses.

### **ESTUDIOS SEROLÓGICOS.**

Se determinaron en los cuatro grupos los niveles de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina con las pruebas de hemoaglutinación indirecta y ensayo visual simple respectivamente<sup>138</sup>.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados obtenidos se sometieron al análisis de varianza y prueba de significancia de Tukey<sup>19,54</sup>.

## RESULTADOS DE LA FASE EXPERIMENTAL.

### TEMPERATURA.

La temperatura rectal en los animales durante los días posteriores a la inoculación de los diferentes antígenos, no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes grupos que recibieron tratamiento, encontrándose que la temperatura promedio más alta fue de  $39.4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . Durante los 4 días posteriores a la exposición viral se registraron incrementos en los grupos D y F, tratados con Leucotoxina y Extracto Soluble Capsular + Leucotoxina + Adyuvante, respectivamente, en donde se observaron temperaturas promedio de  $40.2^{\circ}\text{C}$  habiendo diferencia estadística significativa con respecto a los demás grupos. El incremento más alto que se registró durante el experimento fue posterior a el desafío bacteriano en donde en los dos siguientes días a éste, se registraron temperaturas promedio que variaron desde  $40.11$  hasta  $40.65^{\circ}\text{C}$  presentando la más alta el grupo E tratado con Leucotoxina + Extracto Soluble Capsular (Figura 1).

### ANTICUERPOS ANTICÁPSULA.

El estudio estadístico, de los niveles de anticuerpos anticápsula, muestra una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de los grupos tratados con respecto al grupo testigo (grupo B), no habiendo diferencia estadística entre sí, de los grupos D, E y F (Cuadro 1 y 1a). En la figura 2 puede observarse que los títulos se elevaron de manera uniforme en todos los grupos durante la primera semana posinmunización, para alcanzar los niveles más altos en el día 14 y posteriormente disminuir paulatinamente hasta el día 42 en donde todos los grupos fueron desafiados con *P. haemolytica* y por lo tanto, a partir de ese día se observa un incremento homogéneo en todos los grupos. La mejor seroconversión se apreció en los animales que fueron inmunizados con bacteria viva, ya

que dieron títulos promedio de  $7.0 \pm 1.15$  y la más baja fue del grupo testigo ( $2.57 \pm 0.53$ ), aunque éste último grupo tuvo un incremento de sus títulos promedio, similar a los demás grupos en los días posteriores al desafío experimental.

#### **ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA.**

Los niveles alcanzados en este parámetro, para los grupos inoculados con leucotoxina y bacteria viva respectivamente, mostraron una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los demás grupos que recibieron diferentes tratamientos, incluyendo el grupo control (Cuadro 2 y 2a). También éstos dos grupos lograron los títulos promedio más altos en los días 14 y 21 siendo de  $5.42 \pm 0.53$  y  $5.71 \pm 0.48$  respectivamente. En la Figura 3 muestra el comportamiento similar con respecto a los títulos de anticuerpos posterior a la inmunización en los grupos A y D, para posteriormente disminuir hasta el día 35 cuando fueron expuestos al virus de PI<sub>1</sub>, observándose un incremento constante hasta la finalización del experimento en el día 49. Una situación parecida se observó en los demás grupos (C, E y F), aunque con niveles de títulos más bajos, encontrándose diferencia con respecto al grupo testigo (B), que fue el que menos seroconvirtió ( $2.14 \pm 0.37$ ), pero al ser desafiados con *P. haemolytica* en el día 42, sus valores se incrementaron rápidamente hasta alcanzar en el día 49 el título promedio de  $4.71 \pm 0.48$ .

#### **EVALUACIÓN DEL DAÑO PULMONAR.**

A la necropsia se registró la extensión de lesiones en esquemas como se indica en las figuras 4, 5, 6, 7, 8 y 9 donde las áreas de consolidación más grandes y severas se presentaron en el grupo testigo (grupo B), seguido por los grupos inoculados con Extracto Soluble Capsular + Leucotoxina (grupo E) y Extracto Soluble Capsular + Leucotoxina + Adyuvante (grupo F). Los grupos en donde las lesiones fueron menores

y en donde no se aprecia una diferencia entre éstos, fue en los inoculados con bacteria viva (grupo A), leucotoxina (grupo D) y bacterina comercial (grupo C).

#### **ESTUDIO BACTERIOLÓGICO.**

De los corderos que fueron desafiados, cinco de éstos murieron 48 horas posteriores al desafío; los demás animales fueron sacrificados en el día 49 del experimento. De los 5 corderos que murieron, 1 pertenecía al grupo tratado con bacterina comercial (C), 2 al grupo E tratado con ESC combinado con leucotoxina y 2 al grupo inoculado con leucotoxina, ESC y adyuvante (F), en todos se aisló la cepa de *P. haemolytica* utilizada en el desafío, a partir de pulmón, riñón, bazo e hígado. En el cuadro 3 se puede observar los aislamientos de *P. haemolytica* en los grupos tratados con bacteria viva (A), bacterina comercial (C) y leucotoxina (D) a partir de pulmón en 5 de 7 animales de cada grupo. En los grupos restantes (B, E y F) se logró el aislamiento a partir pulmón de todos los animales del grupo.

#### **ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.**

Las lesiones mas frecuentes que se observaron en los pulmones fueron: pleuritis, congestión, infiltración de células inflamatorias, presencia de fibrina, edema y hemorragias subpleurales.

## **RESULTADOS DE LA FASE 2 DE CAMPO.**

### **ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS ANTICÁPSULA.**

La Figura 10 muestra los niveles de los títulos de anticuerpos séricos anticápsula en la fase de campo en donde se realizaron tres muestreos, espaciados entre sí por periodos de aproximadamente 30 días. La seroconversión de los cuatro grupos fué muy pobre, ya que el título más alto fué de 2.65 +/- 0.59 en el día 30, del grupo inoculado con bacteria viva y donde prácticamente todos los grupos conservaron un mismo nivel de anticuerpos durante todo el experimento, aunque al realizar la prueba de significancia de Tukey (Cuadro 4 y 4a) se encontró diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo tratado con leucotoxina (grupo 1) y al que se le administró bacteria comercial (grupo 2), con respecto a el grupo 3 (testigo) y 4 (inoculado con bacteria viva), aunque éstos últimos no mostraron diferencia estadística entre sí. Cabe mencionar que el grupo testigo inició el experimento con el título promedio más alto (2.62 +/- 0.64) de los grupos y durante toda la evaluación fué superior a los grupos 1 y 2.

### **ESTUDIOS DE NIVELES DE ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA.**

En la figura 11, se observa que los niveles de anticuerpos antileucotoxina de todos los grupos tuvieron un comportamiento similar desde el inicio del estudio y conservaron ese mismo nivel hasta el tercer muestreo. Al realizar el estudio estadístico (Cuadro 5 y 5a) y someter los datos a la prueba de significancia ( $p < 0.05$ ) se encuentra diferencia estadística en el día 60 entre los grupos tratados con Leucotoxina y Bacteria comercial. Es importante resaltar que también existe diferencia estadística entre el grupo Testigo y el tratado con Leucotoxina.

### **EVALUACIÓN CLÍNICA.**

Durante los 60 días que duró el estudio se registraron los datos de morbilidad y mortalidad (Figura 12), encontrándose que la cifra más alta de enfermos de cuadro respiratorio se registró en el grupo 3 (testigo) con 23 que representa el 28.75%, seguido de los tratados con Bacterina comercial (gpo. 2 ), Bacteria viva (gpo. 4 ) y Leucotoxina (gpo. 1) con 5 (6.25%), 4 (5%) y 3 (3.75%) respectivamente. En la mayoría de los casos los animales fueron tratados con quimioterapéuticos y aunque algunos se recuperaron, se registró la muerte de 12 corderos, los cuales estaban distribuidos de la siguiente forma: 5 (6.25%) pertenecían a el grupo testigo, 3 (3.75%) al tratado con la Bacterina comercial y 2 (2.5%) en cada uno de los grupos inoculados con Leucotoxina y Bacteria viva, respectivamente.

**CUADRO 1. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS TÍTULOS PROMEDIO DE ANTICUERPOS ANTICÁPSULA EN CORDEROS INOCULADOS CON ANTÍGENOS DE *Pasteurella haemolytica*, EN LA FASE EXPERIMENTAL.**

F. de V.	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Nivel de significancia
GRUPO	5	283.05059	56.61011	181.32	P<0.05
ANIMAL	6	39.80952	6.63492	21.25	P<0.05
DIAS	7	498.56845	71.22406	228.12	P<0.05
GRUPO*ANIMAL	30	53.51190	1.78373	5.71	P<0.05
GRUPO*DIAS	35	134.87797	3.85365	12.34	P<0.05

r<sup>2</sup>=0.927718

**CUADRO 1a. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE TUKEY**

GRUPO EXPERIMENTAL	N	PROMEDIO	AGRUPAMIENTO
(bacteria viva) A	56	5.321	A
(bacterina comercial) C	56	4.107	B
(leucotoxina) D	56	3.411	C
(leuc+ESC+ady) F	56	3.411	C
(leuc+ESC) E	56	3.179	C
(testigo) B	56	2.339	D

PROMEDIOS CON LETRA DISTINA INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA ENTRE GRUPOS (P<0.05).

**CUADRO 2. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS TÍTULOS PROMEDIO DE ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA EN CORDEROS INOCULADOS CON ANTÍGENOS DE *Pasteurella haemolytica*, EN LA FASE EXPERIMENTAL.**

F. de V.	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Nivel de significancia
GRUPO	5	223.81250	44.76250	311.48	P<0.05
ANIMAL	6	6.70238	1.11706	7.77	P<0.05
DIAS	7	499.75892	71.39413	496.80	P<0.05
GRUPO*ANIMAL	30	23.08333	0.76944	5.35	P<0.05
GRUPO*DIAS	35	90.40178	2.58290	17.97	P<0.05

$r^2=0.958846$

**CÚADRO 2a. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE TUKEY**

GRUPO EXPERIMENTAL	N	PROMEDIO	AGRUPAMIENTO
(bacteria viva) A	56	4.678	A
(leucotoxina) D	56	4.392	B
(leuc+ESC+ady) F	56	3.464	C
(ESC+leuc) E	56	3.160	D
(bacterina comercial) C	56	2.910	E
(testigo) B	56	2.339	F

PROMEDIOS CON LETRA DISTINA INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA ENTRE GRUPOS (P<0.05).

**CUADRO 3. ESTUDIO BACTERIOLÓGICO DE MUESTRAS DE DIFERENTES  
ÓRGANOS DE CORDEROS INOCULADOS CON DIFERENTES ANTÍGENOS DE  
*Pasteurella haemolytica*, EN LA FASE EXPERIMENTAL.**

GRUPO/TRATAMIENTO	Ó R G A N O S			
	PULMÓN	RIÑON	BAZO	HÍGADO
(# DE AISLAMIENOS / #TOTAL ANIMALES X GPO.)				
A /BACT. VIVA	5 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7
B /TESTIGO	7 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7
C /BACT.COMERCIAL*	5 / 7	1 / 7	1 / 7	1 / 7
D /LEUCOTOXINA	5 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7
E /ESC+LEUC.**	7 / 7	2 / 7	2 / 7	2 / 7
F /ESC+LEUC+ADY.***	7 / 7	2 / 7	2 / 7	2 / 7

\* MURIÓ UN CORDERO 48 HRS. DESPUÉS DEL DESAFÍO BACTERIANO.

\*\* DE ESTE GRUPO MURIERON DOS CORDEROS 48 HRS DESPUÉS DEL  
DESAFÍO BACTERIANO.

\*\*\*MURIERON DOS CORDEROS A LAS 48 HRS. DESPUÉS DEL DESAFÍO CON  
*Pasteurella haemolytica*.

**CUADRO 4. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS TÍTULOS PROMEDIO DE ANTICUERPOS ANTICÁPSULA EN CORDEROS INOCULADOS CON ANTÍGENOS DE *Pasteurella haemolytica*, EN LA FASE DE CAMPO.**

F. de V.	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Nivel de significancia
GRUPO	3	81.93645	27.31215	222.13	P<0.05
ANIMAL	79	69.78229	0.88332	7.18	P<0.05
TIEMPO	2	4.43125	2.21562	18.02	P<0.05
GRUPO*ANIMAL	237	178.64687	0.75378	6.13	P<0.05
GRUPO*TIEMPO	6	11.86041	1.97673	16.08	P<0.05

r<sup>2</sup>=0.816884

**CUADRO 4a. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE TUKEY**

GRUPO/TRATAMIENTO	N	PROMEDIO	AGRUPAMIENTO TUKEY
(bacteria viva) 4	240	2.500	A
(testigo) 3	240	2.458	A
(bacterina comercial) 2	240	2.129	B
(leucotoxina) 1	240	1.775	C

PROMEDIOS CON LETRA DISTINA INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA ENTRE GRUPOS (P<0.05).

**CUADRO 5. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS TÍTULOS PROMEDIO DE ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA EN CORDEROS INOCULADOS CON ANTÍGENOS DE *Pasteurella haemolytica*, EN LA FASE DE CAMPO.**

F. de V.	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Nivel de significancia
GRUPO	3	14.35312	4.78437	40.48	P<0.05
ANIMAL	79	111.34895	1.40948	12.03	P<0.05
TIEMPO	2	3.21458	1.60729	13.72	P<0.05
GRUPO*ANIMAL	237	164.39687	0.69365	5.92	P<0.05
GRUPO*TIEMPO	6	35.46875	5.91145	50.46	P<0.05
ANIMAL*TIEMPO	158	23.78541	0.15054	1.28	P<0.05

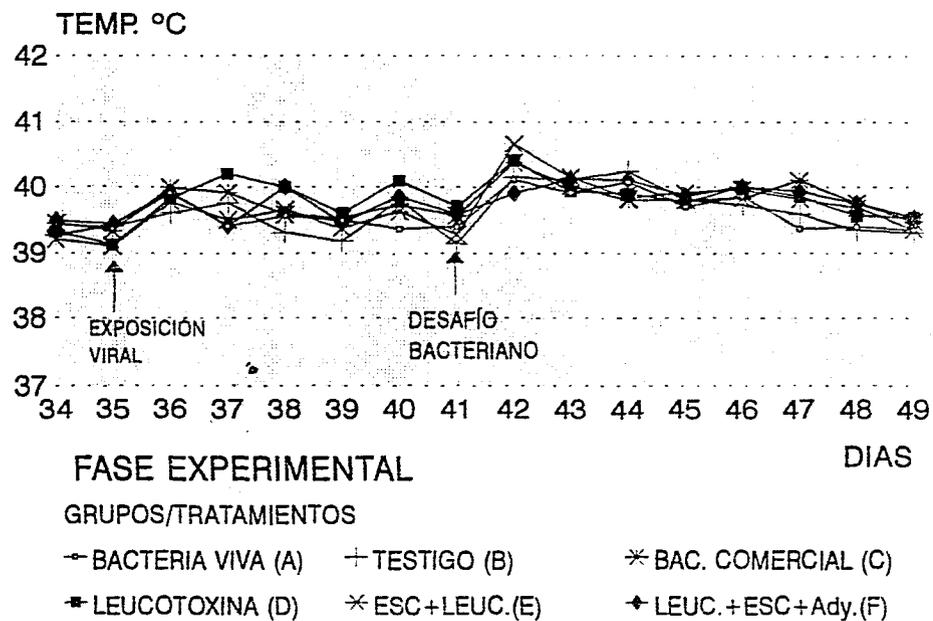
$r^2=0.863927$

**CUADRO 5a. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE TUKEY**

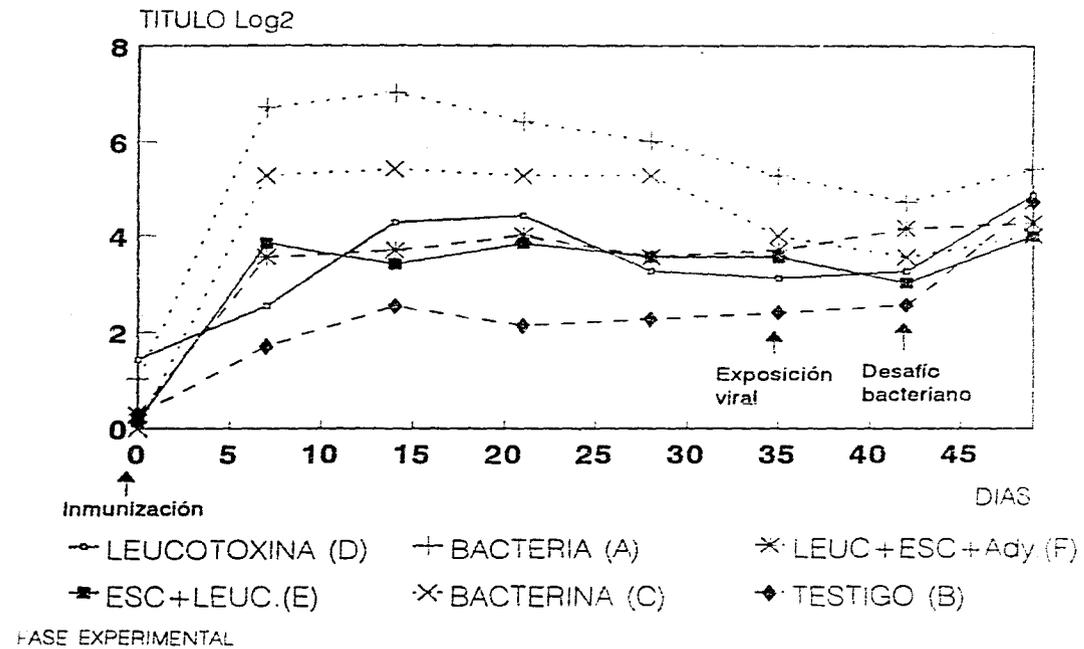
GRUPO	N	PROMEDIO	AGRUPAMIENTO
(leucotoxina) 1	240	4.508	A
(bacteria viva) 4	240	4.325	B
(testigo) 3	240	4.262	B
(bacteria comercial) 2	240	4.175	C

PROMEDIOS CON LETRA DISTINA INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA ENTRE GRUPOS (P<0.05).

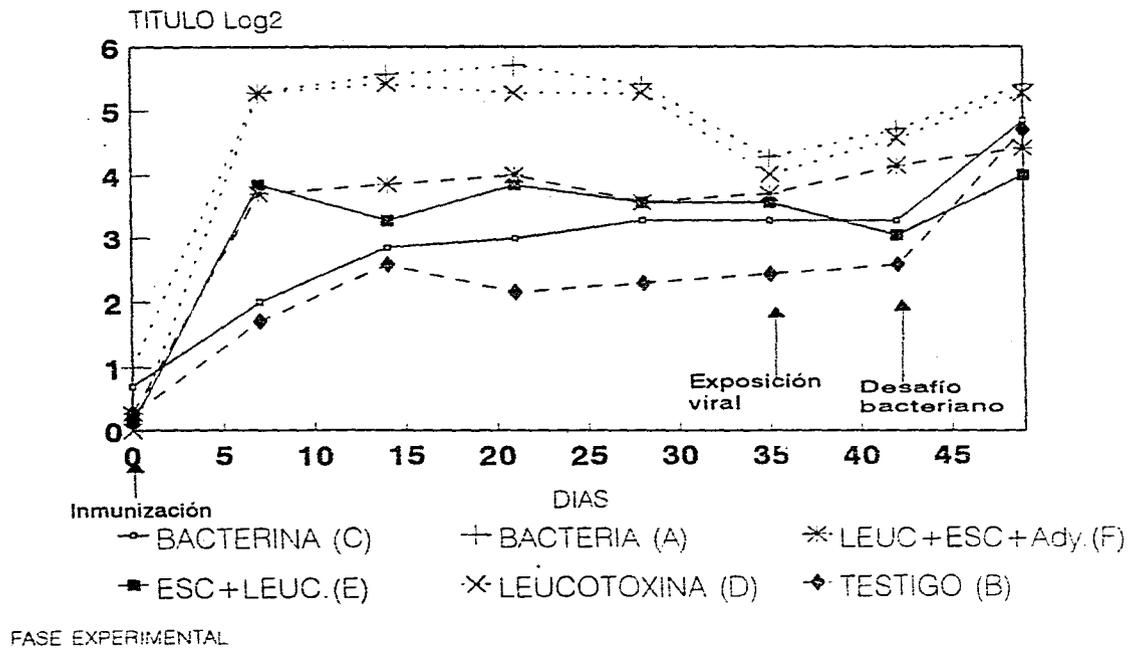
FIG.1. TEMPERATURA RECTAL DE CORDEROS INMUNIZADOS  
CON ANTIGENOS DE *Pasteurella haemolytica*.



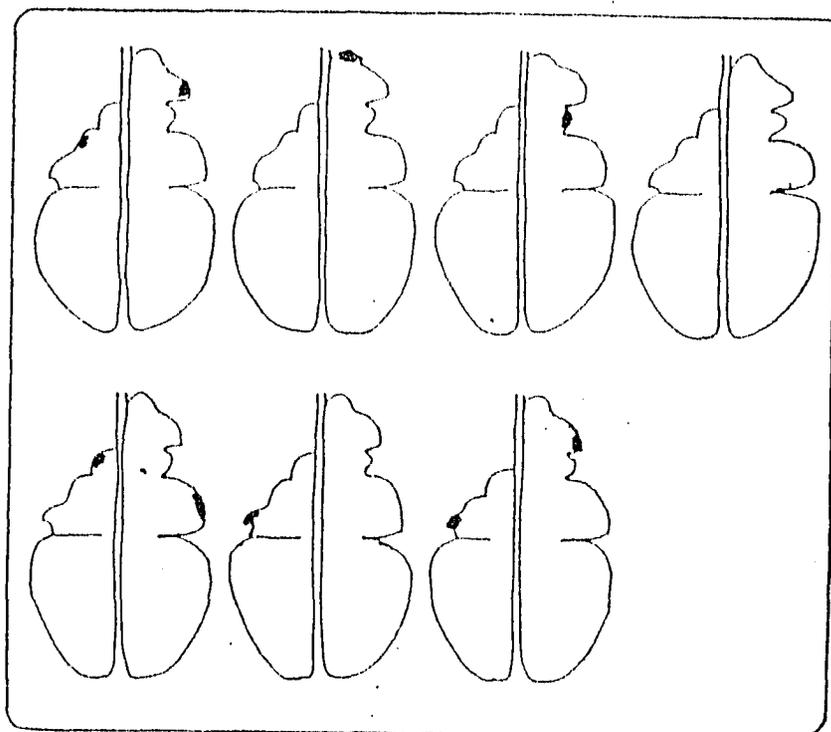
**FIG. 2 ANTICUERPOS ANTICAPSULA EN CORDEROS  
CON LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA**



**FIG.3 ANTICUERPOS CONTRA LEUCOTOXINA EN CORDEROS  
CON LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE.**

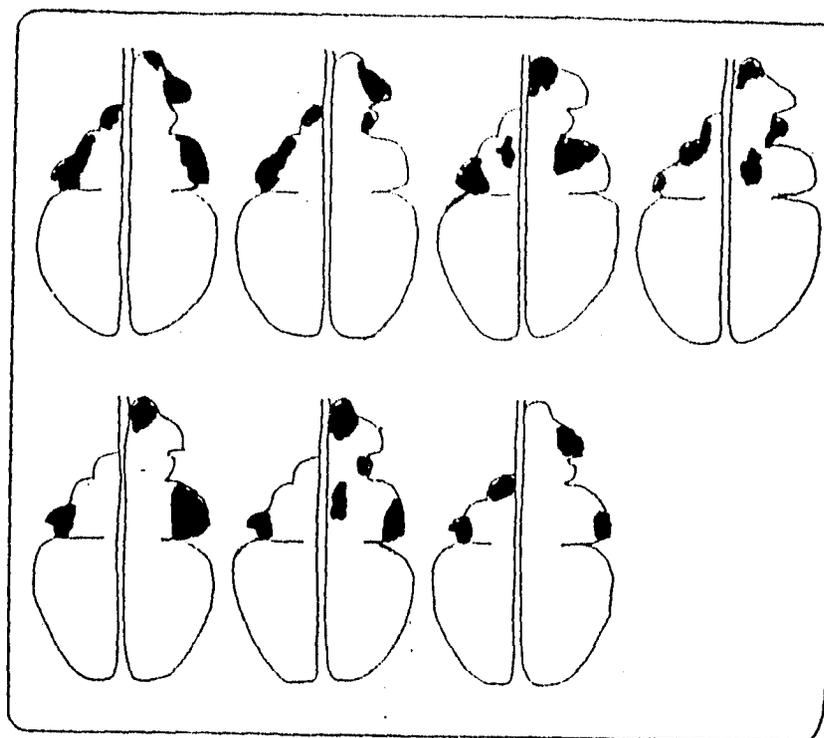


**FIG.4. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO A TRATADOS CON BACTERIA VIVA.**



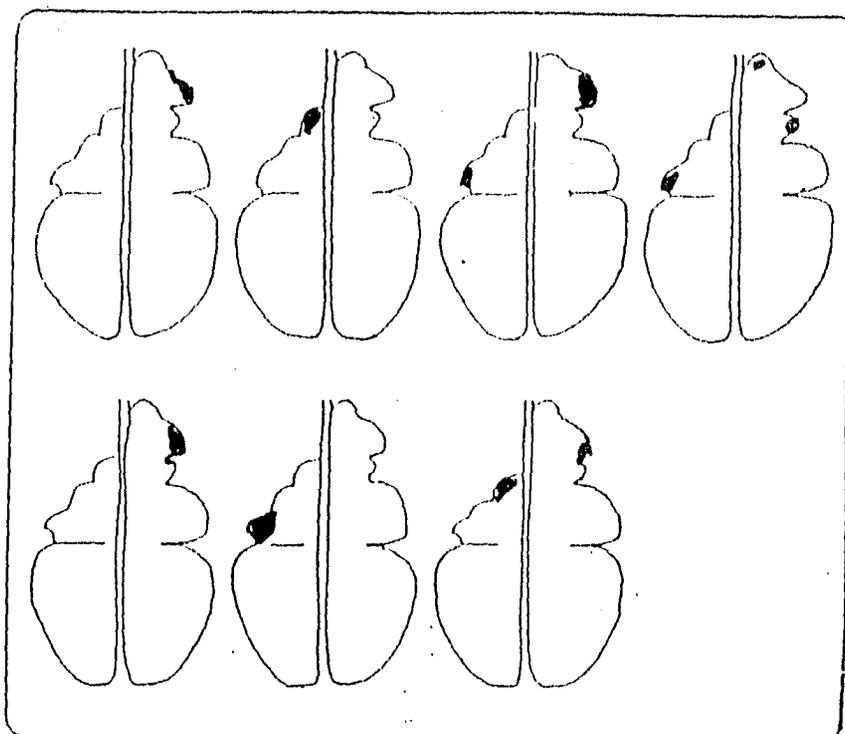
**FASE EXPERIMENTAL.**

**FIG.5. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO B USADOS COMO TESTIGOS..**



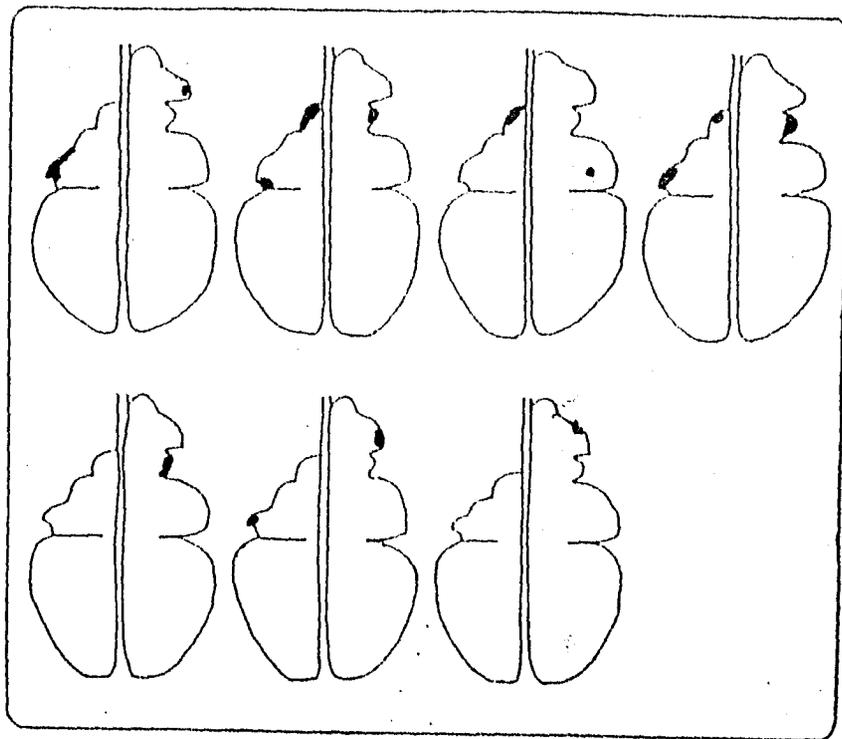
**FASE EXPERIMENTAL.**

**FIG.6. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO C TRATADOS CON BACTERINA COMERCIAL.**



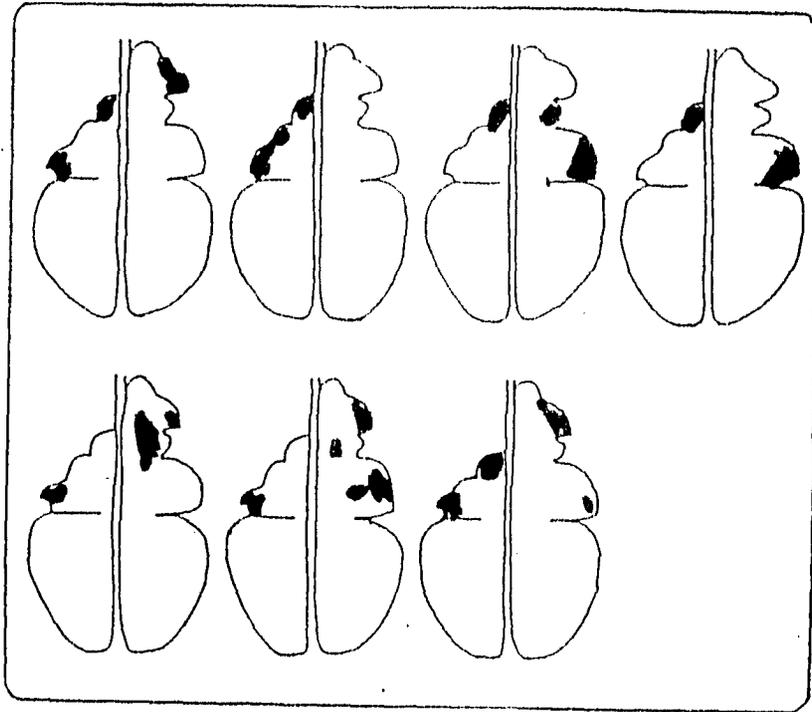
**FASE EXPERIMENTAL.**

**FIG.7. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO D TRATADOS CON LEUCOTOXINA.**



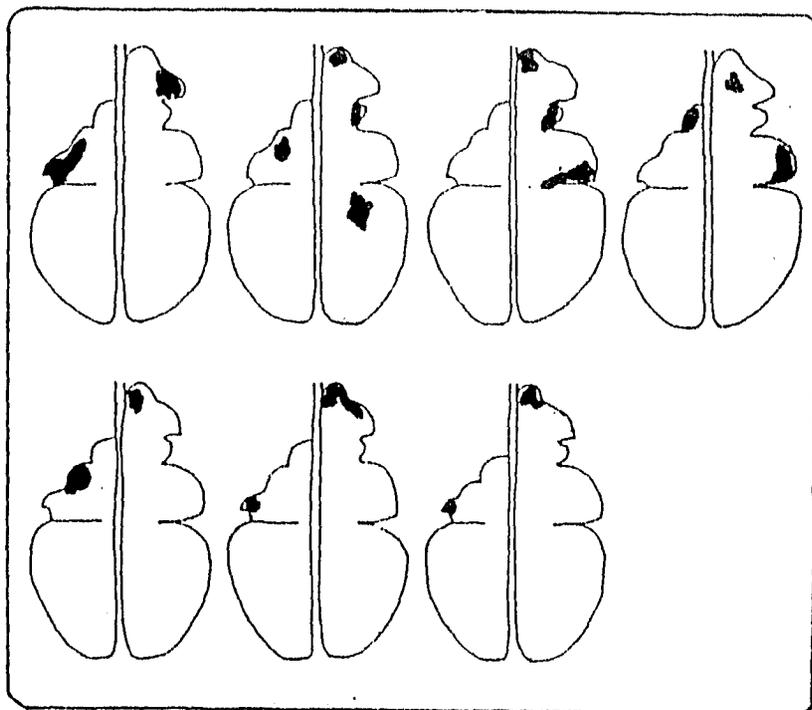
**FASE EXPERIMENTAL.**

**FIG.8. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO E  
TRATADOS CON EXTRACTO SOLUBLE CAPSULAR + LEUCOTOXINA**



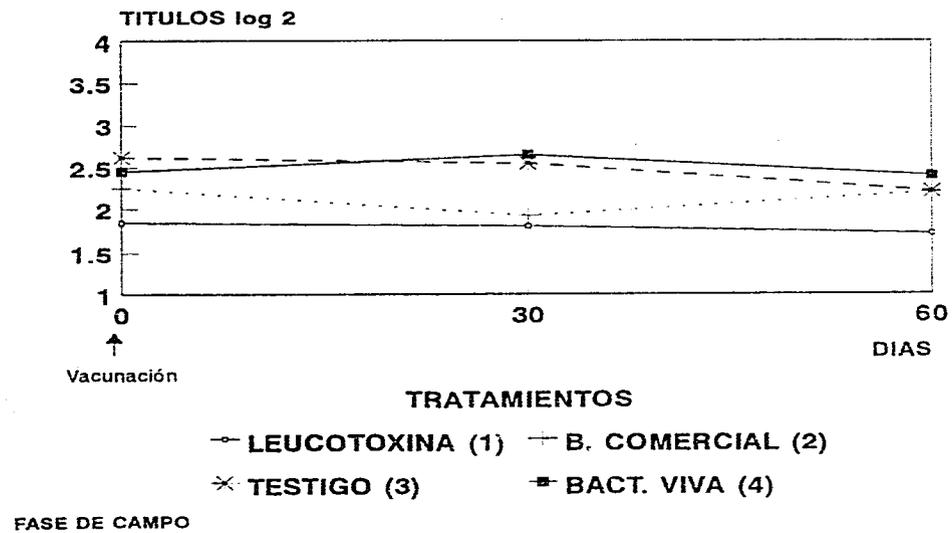
**FASE EXPERIMENTAL**

**FIG.9. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO F  
TRATADOS CON EXTRACTO SOLUBLE CAPSULAR + LEUCOTOXINA  
+ ADYUVANTE.**

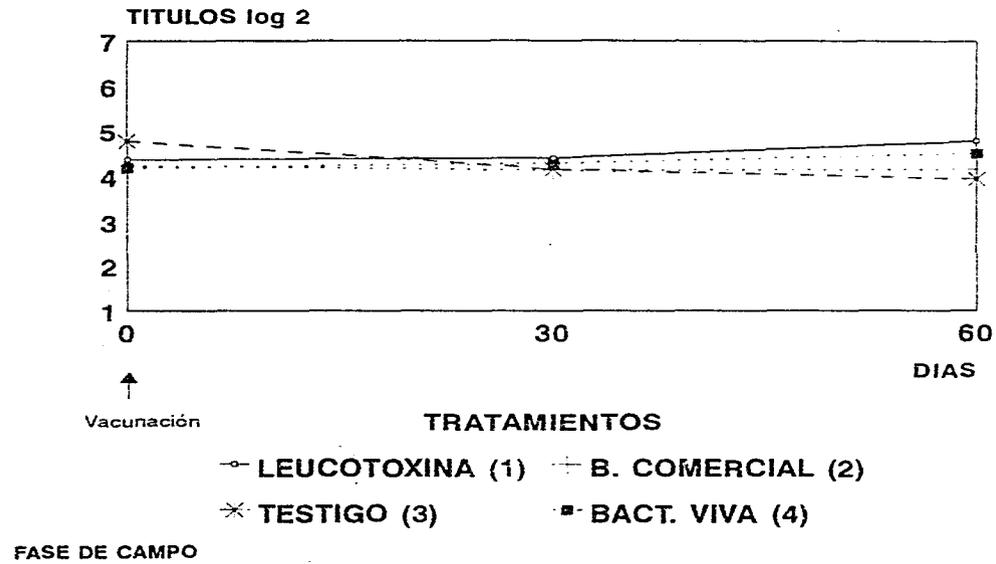


**FASE EXPERIMENTAL**

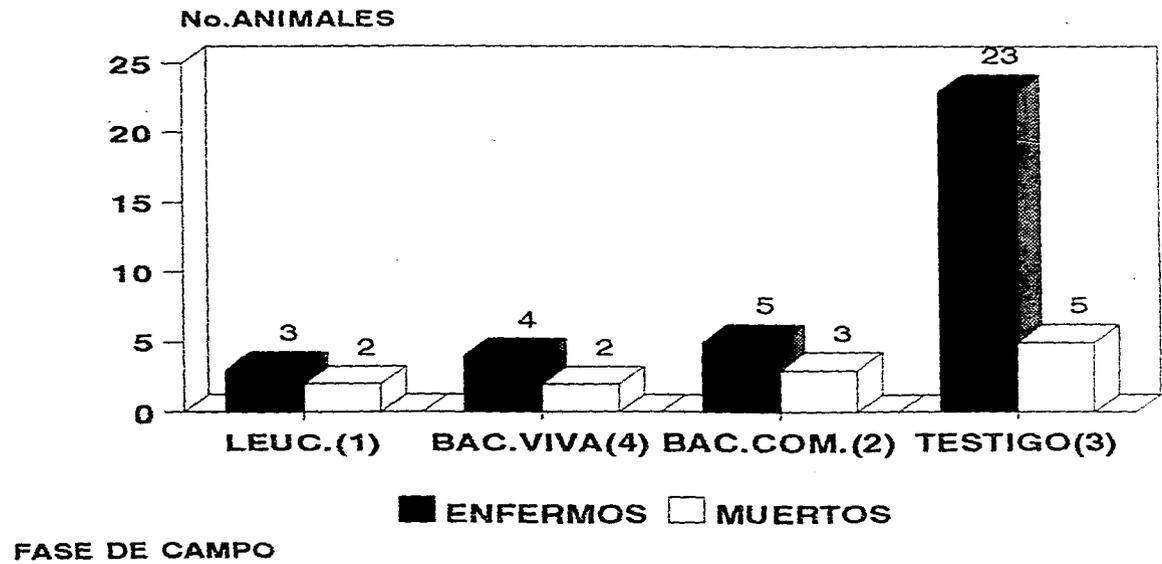
**FIG. 10 ANTICUERPOS ANTICAPSULA EN CORDEROS VACUNADOS CON ANTIGENOS DE P. haemolytica.**



**FIG. 11 ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA EN CORDEROS VACUNADOS CON P. haemolytica.**



**FIG. 12 CORDEROS QUE PRESENTARON PROBLEMAS RESPIRATORIOS.**



## DISCUSIÓN.

La primer variable que se cuantificó en los diferentes grupos de la fase experimental fue la temperatura siendo su comportamiento similar a lo descrito por otros autores<sup>13,47</sup>; se sabe que una de las reacciones postvacunales características es la elevación de la temperatura, aunque en el presente trabajo los valores que se registraron después de la vacunación sólo se incrementaron ligeramente no considerándose como febriles. Las mas altas fueron las del grupo A, que fue vacunado con una suspensión de bacterias vivas.

Los incrementos más evidentes durante el experimento, fueron posteriores a la exposición al virus de PI<sub>3</sub> y al desafío con *P. haemolytica* por vía transtorácica; resultados similares informaron Morales y col. (1993) al probar inmunógenos de *P. haemolytica* por diferentes rutas de inoculación y llevar a cabo exposición viral (PI<sub>3</sub>) y desafío bacteriano experimental. Por otro lado Lehmkuhl y col. (1989) también encontraron incrementos en la temperatura de los ovinos que inocularon con *P. haemolytica* después de infectarlos con adenovirus ovino tipo 6. Es importante destacar que existen trabajos<sup>12</sup>, en los que no se encuentra una relación directa entre temperatura registrada y protección al daño pulmonar por lo que no podemos tomar este parámetro como un dato esencial para valorar un biológico..

Con respecto a los títulos de anticuerpos antileucotoxina, los grupos que mostraron títulos mas altos y tuvieron diferencia estadística significativa con el resto de los grupos, fueron los inoculados con bacteria viva y leucotoxina, coincidiendo que éstos, presentaron las lesiones menos extensas y severas, a diferencia de los grupos B, E y F en quienes se registraron las lesiones mas severas, por lo que en el presente trabajo se encontró una relación directa entre títulos de anticuerpos antileucotoxina y

protección. Es importante que se encuentren presentes anticuerpos neutralizantes de la leucotoxina con la finalidad de que no haya destrucción de leucocitos, ya que representan la primer barrera de defensa pulmonar y como consecuencia se ve reflejado en una mayor resistencia al daño pulmonar. Cabe señalar que las lesiones pulmonares encontradas las que usualmente se producen en casos pasteurelosis pulmonar en condiciones naturales<sup>62,66</sup>.

Con respecto a los antígenos utilizados, se encontró que el grupo tratado con sobrenadante de cultivo (leucotoxina sola) fue uno de los que presentaron una mayor resistencia al daño pulmonar y ningún animal murió al desafío bacteriano, lo que dió un 100% de protección; lo anterior concuerda en parte con lo encontrado por Sutherland (1989) al utilizar Leucotoxina cruda como vacuna en corderos Libres de Patógenos Específicos (SPF) donde obtuvo una protección del 86% al desafío homólogo, sin embargo al utilizar la leucotoxina combinada con un extracto de la bacteria, obtenido con Sulfato de Sodio, encontró una protección del 98%; cifra superior a la encontrada en el presente experimento (grupo E), que al utilizar un antígeno igual, fue de 71.5%, pues de 7 animales que constitufan el grupo murieron 2 a las 48 horas postdesafío.

Cabe señalar que en Investigaciones recientes<sup>45,58</sup>, uno de los aspectos que se ha considerado importante en el desarrollo de biológicos para prevenir la pasteurelosis neumónica en rumiantes domésticos, es el estudio de la leucotoxina producida por *P. haemolytica*. Por ejemplo Sheven (1988) la utilizó para vacunar becerros, encontrando un alto porcentaje de protección.

Es importante destacar que cuando se ha utilizado la leucotoxina purificada los resultados son poco efectivos, no así cuando se emplea el sobrenadante de cultivo en donde se encuentra la leucotoxina, pero también podrían existir componentes de la

baeteria como el polisacárido capsular, el lipopolisacárido(LPS) y proteínas de membrana externa, junto con otros productos de su metabolismo, por lo que éstos podrían estar participando de manera importante en la protección que otorgan a los animales vacunados<sup>5,6,45</sup>.

Con respecto a los niveles de anticuerpos anticápsula, los grupos que tuvieron los títulos más altos fueron el inoculado con bacteria viva (A) o bacterina comercial (C). Cabe mencionar que en grupo A, las lesiones que se registraron fueron las más pequeñas de todos los grupos, seguida de los grupos D y C en grado creciente, encontrándose que de éstos 3 grupos, solamente en el grupo C murió 1 animal al desafío experimental.

En diversos trabajos las vacunas constituidas por bacterias vivas, también han demostrado su efectividad al proteger a los animales vacunados contra el desafío experimental<sup>12,13,50</sup>, coincidiendo con los resultados del presente trabajo . Un aspecto que se debe mencionar es el riesgo que puede existir al manejar microorganismos vivos y que en un momento dado pudiera constituir un riesgo en la salud de los animales que se pretende proteger. Con respecto al uso de las bacterinas, se ha discutido mucho acerca de la protección que brindan, debido que en en la mayoría de las veces se concluye que confieren escasa protección e incluso se menciona que pueden incrementar el daño pulmonar, debido a que cuando los títulos de anticuerpos anticápsula son altos se favorece el mecanismo de opsonización por anticuerpos específicos, facilitando que se lleve a cabo la fagocitosis por los macrófagos alveolares y los neutrófilos, dándose una respuesta de manera exacerbada que se traduce en daño tisular del pulmón<sup>13</sup>.

La forma de registro del daño pulmonar fue subjetiva aunque realizada por una misma persona. El observador registró en un esquema el área lesionada del pulmón,

sin darle ningún valor numérico, por lo que en este tipo de registro cualitativo no pudo efectuarse ningún análisis de tipo estadístico y por lo tanto no puede ser reproducible, a diferencia de lo realizado por Morales(1993) que recortó y pesó dichas áreas registradas en papel encontrando valores numéricos al los que pudo analizar estadísticamente, sin embargo no existe ningún antecedentes de estudios similares que avalen la validéz de dicho método.

El estudio bacteriológico de las muestras de órganos de los 5 animales que murieron a las 48 horas posteriores al desafío, se realizó inmediatamente después de coleccionar las muestras, aislándose en todos los casos a partir de pulmón, riñón, hígado y bazo la cepa de desafío, lo que indica que cuando los animales murieron se encontraban en fase bacterémica. El estudio de los órganos de los 37 corderos restantes se efectuó 7 días después del desafío bacteriano y se aisló *P. haemolytica* de 32 muestras de pulmón, resultando negativo el aislamiento a partir de los demás órganos. Para explicar lo anterior es importante recordar que los mecanismos de defensa del aparato respiratorio son muy efectivos para atrapar, destruir y remover bacterias bajo condiciones normales, pero si los mecanismos fallan, las bacterias se multiplican y producen neumonías. Uno de los factores adversos más importantes son las infecciones virales ocasionando anomalías en la actividad fagocítica del macrófago alveolar que muestra disminución de los receptores de membrana para las porciones Fc de IgG o IgM, así como para la fracción C3b del complemento, por lo cual no pueden utilizar estos anticuerpos opsonizantes en la captura e ingestión de bacterias. Por otro lado también disminuye la capacidad de quimiotaxis, ingestión, de fusión del fagosoma con lisosomas, de inactivación y degradación intracelular, lo que ocasiona finalmente la disfunción del macrófago y que sea destruido por el sistema inmunitario al contener

antígeno viral fagocitado. Por lo tanto, las bacterias pueden permanecer en el tejido pulmonar hasta que se normalice la actividad antibacteriana al generarse nuevos macrófagos alveolares en el día 12 postinfección viral<sup>42</sup>; esto explica que en la mayoría de las muestras de pulmón se haya tenido éxito en la recuperación de *Pasteurella haemolytica* en 86.48%, aunque puede haber influido la vía de desafío que fue transtorácica. La cifra encontrada fue muy superior a la que se menciona en otro trabajo<sup>37</sup> en el que lograron recuperar a la bacteria en el 20% de los animales que sobrevivieron al desafío por vía intratraqueal.

En la evaluación de los inmunógenos en condiciones de campo se presentaron algunas situaciones que pudieron haber influido en los resultados obtenidos; una de ellas fue la formación de los grupos, debido a que el número de animales que se necesitaban por grupo (n=80) fue integrado con animales de diferentes propietarios y que permanecieron en su rebaño, aunque se corroboró que en todos los casos reunieran condiciones similares de alojamiento, alimentación y manejo. Otro aspecto importante es que no se pudieron obtener las muestras sanguíneas en los tiempos planteados (cada 7 días) y solamente se realizaron 3 muestreos en un periodo de 60 días que duró la evaluación, por lo que al analizar las gráficas de los títulos anticápsula y antileucotoxina de todos los grupos, no se observa la curva característica de la respuesta a un inmunógeno.

Con respecto a los parámetros de morbilidad y mortalidad por afecciones respiratorias, el mayor número de animales enfermos (23) se registró en el grupo testigo de los cuales murieron 5; en contraste con el grupo tratado con leucotoxina en el que enfermaron 3, de los cuales murieron 2. El dato anterior es el resultado más importante de esta fase ya que muestra claramente la diferencia que existe, con respecto

a resistencia a la infección del aparato respiratorio, entre los animales que fueron tratados con la leucotoxina y los del grupo testigo.

Los resultados obtenidos en la fase de campo son difíciles de comparar con los obtenidos por otros autores en condiciones de campo, que hayan sido similares a éstas, dadas las características tan particulares en las que se llevó a cabo como fueron las siguientes: los grupos de animales evaluados no estuvieron concentrados en un sólo corral, sino que pertenecían a varios propietarios que en varias ocasiones no cooperaron para que se cumpliera adecuadamente los programas previamente establecidos y acordados con ellos, de tal forma que las inoculaciones y la toma de muestras sufrieron retrasos, habiendo desfase en el plan original y la presencia de variables no contempladas, lo que afectó de manera importante la obtención de los resultados, por lo que tampoco se puede sacar una conclusión definitiva, aunque los resultados encontrados nos permiten pensar que los inmunógenos a base de leucotoxina sola (sobrenadante de cultivo) y bacteria viva, son útiles en la prevención de los problemas respiratorios, pero es necesario evaluarlos en mayor número de rebaños, distintos épocas del año y diferentes zonas geográficas, para poder elaborar una conclusión definitiva al respecto.

También es necesario que en la investigación sobre pasteurelisis neumónica en rumiantes se enfoque hacia aspectos que permitan conocer con más exactitud la patogénesis del complejo respiratorio ya que existen múltiples interacciones huésped-parásito que permiten la colonización, invasión y evasión a las defensas del huésped. Estudiar por ejemplo los factores que permiten la proliferación de *P. haemolytica* en nasofaringe, las sustancias que intervienen en la alteración de la secreción salival o mucosa nasal, las estructuras y/o componentes bacterianos de superficie y los receptores

que son responsables de la adherencia, además de los factores de virulencia que han sido estudiados en parte, tales como: proteínas reguladoras de hierro, proteínas de membrana externa, endotoxinas, leucotoxina, polisacáridos capsulares, fimbrias, antígenos aglutinantes serotipo-específico, neuraminidasa y glicoproteasa neutral<sup>5,9,22,24,59</sup>. El tener un conocimiento detallado de lo anterior permitiría determinar el papel que juegan los factores de virulencia en la patogénesis de la pastereosis neumónica y desarrollar cepas mutantes incorporando plásmidos por conjugación, lo que permitiría la medición *in vivo* e *in vitro* de diversos factores de virulencia. Otro aspecto importante es la cuantificación y caracterización del perfil antigénico potencialmente protector de las bacterias patógenas, para su incorporación a las vacunas, probar su eficacia y seguridad en la especie que va a ser utilizada<sup>59,59</sup>.

## CONCLUSIONES.

- Se produjeron y probaron biológicos experimentales, compuestos por bacterias vivas y leucotoxina (sobrenadante de cultivo), capaces de evitar el daño pulmonar producido por el desafío experimental.
- Se encontró que el sobrenadante de cultivo (leucotoxina) protegió adecuadamente en el desafío experimental y durante la fase de campo, el grupo tratado con este antígeno mostró el menor número de animales enfermos y muertos.
- En la fase experimental del presente trabajo y bajo las condiciones en que se realizó, se observó que existió una relación directa entre títulos de anticuerpos y resistencia al daño pulmonar.
- Se observó que los biológicos que protegieron en la fase experimental, brindaron protección en condiciones de campo; aunque las evidencias no son concluyentes.
- Se considera que es necesario realizar más evaluaciones en condiciones de campo.
- Es necesario continuar con la investigación en neumonías en rumiantes, abordando puntos como: interacción virus bacteria, factores de patogenicidad de los principales agentes bacterianos involucrados, antígenos bacterianos potencialmente utilizables en la elaboración de biológicos polivalentes (virus-bacterias).

#### LITERATURA CITADA.

- 1.- Babink, L.A., Morsey, M., Campos, M. and Harland, R.: Viral-bacterial synergy. Abstract book *IAP94 in Edinburgh, Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella. International Conference*. UK, 31 July-4 August, p. 21(1994).
- 2.- Balayut, C.S., Simonson, R.R., Demrick, N.J. and 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.- Biberstein, E.L.: Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: *Methods in microbiology*. Bergeys, T. and Norris, J. R., USA 10: 253-269 (1978).
- 4.- Bisgaard, M. : Taxonomy of the IIPA group. Abstract book *IAP94 in Edinburgh, Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella. International Conference*. UK, 31 July-4 August p. 16(1994).
- 5.- Brogden, A.K. and Audibert, F. : Protection of cattle by a *Pasteurella haemolytica* polysaccharide+muramyl dipeptide subunit vaccine. *Memorias del seminario: Pasteurelosis neumónica del ganado bovino*. Monterrey, N.L., México, 1995: 47-49, *Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L.* (1995).
- 6.- Brogden, A.K., DeBey, B. and Cutlip, R.: Lesions induced in vivo by cell-associated products of *Pasteurella haemolytica* and their role in the pathogenesis of bovine respiratory disease. *Memorias del seminario: Pasteurelosis neumónica del ganado bovino*. Monterrey, N.L., México, 1995: 23-29, *Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L.* (1995).
- 7.- Burrows, L.L.; Olah-winfied, E. and Lo, R.Y.C.: Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect. Immun.* 61, 5001-5007 (1993).
- 8.- Clinkenbeard, K. D.; Clinkenbeard, A.P. and Waurzyniak, B. J.: Chaotropic agents cause disaggregation and enhanced activity of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Veterinary microbiology*, 45: 201-209 (1995)
- 9.- Confer, A.W., Clinkenbeard, K.D. and Murphy, G.L.: Pathogenesis and virulencia of *Pasteurella haemolytica* in cattle; an analysis of current knowledge and future approaches. Abstract book *IAP94 in Edinburgh, Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella. International Conference*. UK, 31 July-4 August p. 19-20(1994).
- 10.- Confer, A. W. and Durham, J. A.: Sequential development of antigens and toxins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1 grown in cell culture medium. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 646-652 (1992)
- 11.- Confer, A.W., Durham, A.J. and Clarke, R. C.: Comparison of antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1 grown *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Vet. Res.* 53 (4): 472-476 (1992).

- 12.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. and 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.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J., Fulton, R.W. and 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).
- 14.- Confer, A.W., Panciera, R.J. and Molser, D.A.: Bovine pneumonic pasteurellosis: immunity to *Pasteurella haemolytica*. *J.A.V.M.A.* 193: 1308-1316 (1988).
- 15.- Conlon, P.; Gervais, M.; Chaudhari, S. and Conlon, J.: Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxic culture supernatant on bovine neutrophil aggregation. *Can J Vet Res* 56: 199-203 (1992)
- 16.- Cowan, S.T. y Steel, K.J.: Manual para la identificación de bacteria de importancia médica. *Compañía Editorial Continental S.A.* México, 1979.
- 17.- Chae, C.H., Gentry, M.J., Confer, A.W. and Anderson, G.A.: Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica*, serotype 1. *Vet. Microbiol.* 25: 241-251 (1990).
- 18.- Chang, Y.; Young, R.; Post, D. and Struck, D.: Identification and characterization of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 55, 2348-2354 (1987).
- 19.- Daniel, W.W.: Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. 1a. ed. *Ed. LIMUSA*, México, D.F. 1980.
- 20.- 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.* 57: 711-716 (1989).
- 21.- Donachie, W. and Gilmour, J.L.: Sheep antibody response to cell wall antigens expressed *in vivo* by *Pasteurella haemolytica* serotype A2. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 271-276 (1988).
- 22.- Donachie, W.: Vaccine development against *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. Abstract book. *HAP94 in Edinburgh, Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella. International Conference.* UK, 31 July-4 August p. 18-19 (1994).
- 23.- Durham, J.A., Confer, A.W., Mosler, D.A. and 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):1946-1951 (1986).
- 24.- Fenwick, B.: Liposaccharides and capsules of the HAP group of bacteria. Abstract book. *HAP94 in Edinburgh, Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella. International Conference.* UK, 31 July-4 August p. 27 (1994).

- 25.- Fillion, L.A., McGuire, R.L. and Babiuk, L.A.: Non specific suppressive effect of bovine herpes virus type 1 on bovine leucocyte function. *Infect. Immun.* 42:106-112 (1983).
- 26.- Fillion, L.A., 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).
- 27.- Freund, S.C.W., Wilkie, B.N. and Thomas, R.G.: Bovine pneumonic pasteurellosis: experimental induction in vaccinated and non-vaccinate calves. *Can. J. Comp.* 41: 77-83 (1977).
- 28.- Gentry, M.J., Confer, A.W., and Kops, J.A.: Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxic neutralization antibody titers in cattle sera. *J. Clin. Microbiol.* 22: 763-772 (1985).
- 29.- 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.
- 30.- Hernández, Z.J., Tórtora, P.J., Martínez, H.A. y Piñón, 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, México, D.F. (1985).*
- 31.- Himmel, M.E., Yates, M.D., Laurerman, L.H. and Squiere, P.G.: Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 43: 764-767 (1982).
- 32.- Jean, Y.H. and Bak, U.B.: Pathological studies on the calf pneumonia experimentally induced by endotoxin and leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1. *J. Agric. Sci. Vet.* 35:1, 643-658. (1993).
- 33.- Jensen, R.R., Pierson, P.E., Weibel, J.C., Tucker, J.O. and Swift, B.L.: Middle ear infection in feedlot lambs. *J.A.V.M.A.* 181 (8): 805-807 (1982).
- 34.- Jones, G.E., Donachie, W., Sutherland A.D. Knox, D.P. and Gilmour, J.S.: Protection of lambs against experimental pneumonic pasteurellosis by transfer of immune serum. *Vet. Microbiol.* 19: 175-181 (1989).
- 35.- Klorpes, A.L., Collins, M.T., Goerke, T.P., Traul, D.L., Confer, A.W., Gentry, M.J. and Baumann, L.E.: Immune response of neonatal lambs to a modified live *Pasteurella haemolytica* vaccine. *Small. Rumin. Res.*, 4: 73-84 (1991).
- 36.- LeaMaster, B.R., Evermann, J.F. and 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): 1545-1547 (1987).

37.- Lehmkuhl, H.D., Contreras, J.A., Cutlip, R.C., and Brodgen, A.K.: Clinical and microbiologic findings in lambs inoculated with *Pasteurella haemolytica* after infection with ovine adenovirus type 6. *Am. J. Vet. Res.* 50: 671-675 (1989).

38.- Lo, R.Y.C.: Molecular studies of antigens in HAP organisms. Abstract book. *HAP94 in Edinburgh, Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella. International Conference.* UK, 31 July-4 August p. 22-23 (1994).

39.- Luna, L.G.: Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd. Ed. *Mac Graw-Hill Book Company.* USA. 36. (1968).

40.- Malore, F.C., MacCullough, G.J., MacLoughlin, M.T., Rall, H.J. and Ohagan, J., Neill, S.D.: Infectious agents in respiratory disease of housed fattening lambs of Northern Ireland. *Vet. Rec.* 122 (9): 203-207 (1988).

41.- Markham, R.J. and Wilkie, B.N.: Interaction between *Pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages. Cytotoxic effect on macrophage and impaired phagocytosis. *Am. J. Vet. Res.* 41: 10-22 (1980).

42.- Martínez, B.J.: Efectos adversos sobre los mecanismos de depuración pulmonar del tracto respiratorio y su relación con la pasteurellosis neumónica. Memorias del seminario: pasteurellosis neumónica del ganado bovino. Monterrey, N.L., México, 1995:10-17, *Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L.* (1995).

43.- Méndez, R.I., Namihira, G.D., Moreno, A.L., y Sosa, C.: El protocolo de investigación. *Editorial Trillas*, segunda edición México D. F. (1990).

44.- Modernización del campo: programa especial de fomento a la ganadería. *S.A.R.H.*, México, D.F. Febrero, 1990.

45.- Moiser, D.A., Confer, A.W. and Panciera, R.J.: The evolution of vaccines of bovine pneumonie pasteurellosis. *Res. Vet. Sci.* 47: 1-10 (1989).

46.- Montes de Oca, J. R., Velázquez, O.V. y Martínez, R.C.: Causas de mortalidad en corderos de 0 a 90 días en el Valle de Toluca. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985. Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional. *UNAM-SARH*, México D.F., 1985.

47.- Morales, A.J.F., Jaramillo, M.L., Oropeza, V.Z., Tórtora, P.J.L., Trigo, T.J.F. y Espino, R.G.: Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Vet. Méx.*, 24 (2): 97-105 (1993).

48.- Morck, D.W., Olson, M.E., Acres, S.D., Daoust, P.Y. and Costerton, J.W.: Presence of bacterial glycocalyx and fimbriae on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can. J. Vet. Res.* 53:2, p 167-171 (1989).

- 49.- Moore, R.N., Walker, R.D., Shaw, G.A., Hopkins, F.M. and Shull, EP.: Antitelenkotoxin antibody produced in the bovine lung after aeroexposure to viable *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1949-1952 (1985).
- 50.- Panciera, R.J., Corstvet, R.E., Confer, A.W. and Gresham, C.N.: Bovine pasteurellosis: effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am.J. Vet. Res.* 45 (12),2538-2542(1984).
- 51.- Pérez, G.E.: Curso de epidemiología básica. *Agencia Internacional de Energía Atómica*. p 45, Yucatán, México (1994).
- 52.- Ramírez, R., Tapia, H.L. y 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. *UNAM-SARH México, D.F.*, (1984).
- 53.- Rosenstel, E.: Prontuario de especialidades veterinarias. 14 ed. *Ediciones P.L.M.*, México, D.F. 1993-1994.
- 54.- SAS Institute Inc.:SAS User's guide Basics. SAS Institute Inc. North Caroline 1982.
- 55.- Schimmel, D., Erler, W. and Feist, H.: Experimental immunization of calves with various *Pasteurella* antigens. *Deutsche-Tierarzliche-Wochenschrift*. 99:5, 204-206 (1992)
- 56.- Segura, J. y Honhold, N.: Manual de muestreo para la salud y producción animal. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México (1993)*.
- 57.- 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).
- 58.- Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Vaccination of calves with leucotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can. Vet. Res.* 52: 30-36 (1988).
- 59.- Shewen, E.P.: Host response to infection with HAP: implications for vaccine development. Abstract book. *HAP94 in Edinburgh, Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella. International Conference. UK, 31 July-4 August p. 32-33 (1994)*.
- 60.- Suárez, G.F.: Características bacteriológicas del género *Pasteurella*. Memorias del seminario: Pasteurellosis neumónica del ganado bovino. Monterrey, N.L., México, 1995: 1-5, *Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L.* (1995).
- 61.- Sutherland, A.D., Donachie, W. and Jones, G.E., Quiric, M.: A Crude cytotoxin vaccine protects sheep against experimental *Pasteurella haemolytica* serotype A-2 infection. *Vet. Microbiol.* 19: 175-181 (1989).

- 62.- Thompson, R.G.: Special Veterinary Pathology. Edited by B.C. Decker Incorporated, Philadelphia, USA, p 92-96 (1994).
- 63.- Thrusfield, M.: Epidemiología Veterinaria. Ed. Acribia, Zaragoza, España, p.219-220, (1990).
- 64.- 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).
- 65.- Trigo, J.F. y Romero, J.: La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. *Vet. Mex.* 17 116-119 (1986).
- 66.- Trigo, T.J.F.: Patología Sistémica Veterinaria. 2a. ed. Ed. Interamericana. McGraw-Hill p 147-155 (1992).
- 67.- Trigo, T.J.F.: El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos Memorias del seminario: Pasteurellosis neumónica del ganado bovino. Monterrey, N.L., México, 1995:18-22, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L. (1995).
- 68.- Waurzyniak, B.J.; Clinkenbeard, K.D.; Confer, A.W. and Srikskumar, S.: Enhancement of *Pasteurella haemolytica* leukotoxic activity by bovine serum albumin. *Am. J. Vet. Res.*, 55: 1267-1274 (1994)
- 69.- Weiss, D.J.; Bauer, M.C.; Whiteley, L.O.; Maheswaran, S.K. and Ames, T.R.: Changes in blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves with experimental induced pneumonic pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.*, 52: 337-344 (1991).