

1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCION
DE LEUCOTOXINA DE AISLAMIENTOS DE *Pasteurella*
haemolytica OBTENIDAS DE OVINOS CON
DIFERENTES CUADROS NEUMONICOS Y DE
MICROBIOTA NORMAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N ,
ALANIS MARTINEZ MARIA EUGENIA
BERNARDINO OLVERA SANDRA ARACELI

ASESORES:

M.C. M.V.Z. JOSE FRANCISCO MORALES ALVAREZ.
M.V.Z. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ.
Q.F.B. LAURA JARAMILLO MEZA.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**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 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

B. N. A. A.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT: N: Ing. Rafael Rodríguez Cárdenas
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
"Evaluación de la capacidad de producción de leucotoxina de aislamientos de Pasteurella haemolytica obtenidas de ovinos con diferentes cuadros neumónicos y de microbiota normal".

que presenta la pasante Alanís Martínez María Eugenia
con número de cuenta: 8603330-3 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 20 de Junio de 1996

PRESIDENTE	M. en C. Rita del Castillo Rodríguez	<i>Rita del Castillo Rodríguez</i>
VOCAL	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	<i>Jorge Luis Tórtora Pérez</i>
SECRETARIO	M. en C. José Francisco Morales Álvarez	<i>José Francisco Morales Álvarez</i>
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce	<i>Rodolfo Córdoba Ponce</i>
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra	<i>Marco Antonio Mendoza Saavedra</i>



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES
UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
"Evaluación de la capacidad de producción de leucotoxina de aislamientos de Pasteurella haemolytica obtenidas de ovinos con diferentes cuadros neumónicos y de microbiota normal".

que presenta la pasante: Bernardino Olivera Sandra Araceli
con número de cuenta: 9057378-7 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de Junio de 1996

PRESIDENTE	M. en C. Rita del Castillo Rodríguez	
VOCAL	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
SECRETARIO	M. en C. José Francisco Morales Álvarez	
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra	

**TODOS LOS SERES HUMANOS HEMOS
RECIBIDO LA MISMA OPCIÓN PARA
REALIZARNOS, LA DIFERENCIA ESTA
EN AQUELLOS POCOS QUE HAN DECIDIDO
ACTUAR.**

**A QUIENES SIEMPRE ESTAN A
NUESTRO LADO INCONDICIONALMENTE,
DANDONOS SU AMOR, AMISTAD, FIDELIDAD,
Y EN OCASIONES SU SUFRIMIENTO Y SU VIDA
SIN RECIBIR NADA A CAMBIO.**

**A ELLOS; LOS ANIMALES
¡MIL GRACIAS !**

EUGENIA Y SANDRA.

DEDICATORIAS:

A MI MADRE; Sra. Juana Martínez de Alanís Por ser el mayor apoyo durante todo este tiempo.

A MI PADRE; Sr. Gregoria Alanís Avila Con admiración y cariño en su memoria.

A MIS HERMANOS; Guillermo, Hugo y Ma. de la Cruz, Por estar a mi lado y apoyarme siempre.

A MIS SOBRINOS; Osmara y Aldehara a los cuales quiero mucho y que Dios bendiga por siempre.

A UNA PERSONA MUY ESPECIAL; Juan Jimenez. Chávez Con todo mi amor.

A MIS TIOS Y PRIMOS; Con cariño.

A MIS AMIGOS; Isabel, Anselmo, Rosendo, Moisés, Elier, Onésima y Martha Olivia.

A MI MEJOR AMIGA; SANDRA BERNARDINO OLYERA. Gracias por la confianza que depositaste en mí, espero contar siempre con tu amistad.

A MI GATO.

A TI SEÑOR, SIMPLEMENTE, ¡GRACIAS!

EUGENIA

DEDICATORIAS.

CON TODO EL AMOR QUE EXISTE EN MI CORAZON TE AGRADEZCO A TI SEÑOR EL HABERME DADO TODO LO QUE TENGO Y MUY EN ESPECIAL A MI FAMILIA.

A MIS PADRES; Sra. ANTONIA OLVERA HERNANDEZ Y AL Sr. ABEL BERNARDINO ARANGO. Por todo el amor, paciencia, confianza y apoyo con el cual me impulsaron para la realización de este sueño que ahora ya es realidad. **¡LOS QUIERO CON TODA MI ALMA !**

A MIS HERMANOS; Elizabeth, Israel, David, José y Elías con todo mi infinito amor. **¡Gracias por su apoyo y paciencia !**

A MI SOBRINO; José Antonio porque con su llegada llenó de luz nuestras vidas y nos da más fuerzas para seguir adelante.

A TODOS MIS AMIGOS; Heber, Alfonso, Fabricio, Diana, Oscarito, Mary's, Fabís, Maru, Moisés, Esmeralda, Ricardo, Carlitos, Celia, Luis y Paty. Por toda la paciencia que me tuvieron y por esa gran amistad que ojalá nunca termine.

A EUGENIA; porque a pesar de todo lo logramos y aquí está nuestro sueño hecho realidad. **¡Gracias por tu valiosa amistad !**

A LA FAMILIA NACAR RODRIGUEZ; Por la confianza que depositaron en mí . Mi amor y agradecimiento es poco para lo que ustedes se merecen.

SANDRA.

AGRADECIMIENTOS:

A NUESTROS ASESORES DE TESIS;

M.V.Z. M.C. José Francisco Morales Alvarez: por la distinción de otorgarnos este trabajo, su tiempo, amistad y apoyo.

Q.F.B. M.C. Laura Jaramillo Meza: por la invaluable ayuda prestada al presente trabajo y a sus muy atinadas recomendaciones.

AL MVZ Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz por su apoyo ilimitado para la realización de este trabajo.

A NUESTROS SINODALES: *M. en C. Ritu del Castillo Rodríguez, Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez, MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce, MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra. Por el tiempo dedicado en la revisión de ésta tesis.*

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN Y A LOS PROFESORES; *Por los conocimientos adquiridos, y muy en especialmente al MVZ. JUAN CARLOS DEL RIO GARCIA, Por su amistad incondicional y sus buenos consejos.*

A LA M. en C. MVZ. Araceli Hernández Veríz y al MVZ. Arsenio Sordo Alemán por contribuir de una manera muy directa a nuestra formación profesional.

A TODOS NUESTROS AMIGOS DEL CENID-MICROBIOLOGIA; *Paulino, Efrén, Sandra, David, Carlos, Luis, Abraham, Héctor, Víctor, Jesús, Eduardo, a los Franciscos, al Dr. Arturo y a las Dras. Laura Jaramillo y Laura Hernández. POR SU AYUDA Y APOYO.*

Este trabajo fue apoyado por el programa de BECA-TESIS de la FES-CUAUTITLAN.

INDICE

Página

1.- INTRODUCCION.....	1
2.- HIPOTESIS	10
3.- OBJETIVOS	11
4.- MATERIAL Y METODOS	12
5.- RESULTADOS	16
6.- GRAFICAS	22
7.- DISCUSION	30
8.- CONCLUSIONES	36
9.-LITERATURA CITADA	38

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCION DE LEUCOTOXINA DE AISLAMIENTOS DE *Pasteurella haemolytica* OBTENIDAS DE OVINOS CON DIFERENTES CUADROS NEUMONICOS Y DE MICROBIOTA NORMAL.

INTRODUCCION.

En México las neumonías son consideradas de suma importancia en los animales domésticos debido a que afectan directamente al proceso productivo de las explotaciones. Las pérdidas económicas que ocasionan son atribuidas al alto costo de los tratamientos, la pérdida de peso, las bajas conversiones alimenticias que conllevan a retraso en el crecimiento de los animales y la mortalidad que ocasiona en poblaciones susceptibles.^{1,2}

Pasteurella haemolytica es una de las principales bacterias causantes de enfermedades respiratorias en rumiantes. Es una bacteria Gram negativa de forma cocobacilar, inmóvil, capsulada, oxidasa (+), aerobia y anaerobia facultativa; crece en agar Mc. Conkey, en medios enriquecidos como agar sangre y agar chocolate, produce hemólisis. La presencia de cápsula le confiere a la bacteria propiedades antifagocíticas.

Por hemoaglutinación indirecta se han reconocido 17 serotipos de acuerdo a antígenos capsulares solubles.^{3,4} éstos antígenos son básicamente polisacáridos y glicoproteínas con capacidad antigénica alta. Así mismo se han designado los biotipos A y T de acuerdo a características bioquímicas de la bacteria.⁵ Los serotipos

1,2,5,6,7,8,9,11,12,13,14,16 y 17 corresponden al biotopio A que produce neumonía y septicemia en corderos y neumonía en borregos adultos, este biotopio fermenta a la arabinosa mientras que el biotopio T fermenta a la trehalosa y sus serotipos son el 3,4,10 y 15 causantes de septicemia en adultos." La bacteria produce en fase logarítmica de crecimiento una sustancia soluble, tóxica para macrófagos alveolares y leucocitos de rumiantes únicamente^{11,12,13}; esta sustancia es mejor conocida como leucotoxina, está constituida principalmente por una fracción proteica. Es sensible a tripsina debido al componente proteico esencial, su actividad citotóxica óptima ocurre a 37°C y se inhibe a 4°C es estable a pH de 2 a 12 y es resistente al calor hasta 60°C."

La leucotoxina es una citolisina que produce poros en la membrana celular, compuesta por dos o más subunidades proteicas con pesos moleculares de 105 mil Daltones, que daña a las células blanco por un mecanismo similar al de otras citolisinas bacterianas; insertándose en la membrana citoplasmática con la resultante formación o producción de un poro transmembranal, permitiendo la salida de potasio intracelular e incorporación de calcio y sodio extracelular, con ello la presión osmótica intracelular aumenta y la célula se hincha con la consecuente lisis y salida de componentes citoplasmáticos."¹⁴

En trabajos de ingeniería genética se ha demostrado que el gen lktCABD de la leucotoxina de *P. haemolytica* es homólogo al locus hlyCABD de la hemolisina de *E. coli*."

La leucotoxina es considerada como uno de los principales factores de virulencia en la patogénesis de la enfermedad; por lo que se ha considerado que la inmunización con ésta puede conferir protección contra la actividad tóxica, independientemente del serotipo que se encuentre involucrado en la neumonía debido a que la leucotoxina es producida por los diferentes serotipos de *P. haemolytica* y las características de esta toxina son muy similares en todas ellas."

Otra habilidad de la bacteria es que forma parte de la flora bacteriana de las vías respiratorias altas " ". En el proceso infeccioso pueden involucrarse también agentes oportunistas como *Staphylococcus* spp, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma ovipneumoniae* y *Bordetella parapertussis* " " .

Se ha mencionado que factores predisponentes desempeñan una función determinante en el desarrollo de la enfermedad, como son condiciones adversas del medio ambiente y mala alimentación. " Además, se ha demostrado la necesaria participación de agentes primarios de tipo viral capaces de iniciar el complejo neumónico sin embargo aun no se sabe como actúan. Entre estos virus se pueden mencionar: adenovirus, virus respiratorio sincitial y parainfluenza 3, entre otros. " "

La neumonía causada por *P. haemolytica* se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa severa. Sin embargo se logra aislar este agente de cuadros neumónicos que varían en cuanto a su severidad y morfolopatología. En esta diversidad de cuadros pueden intervenir varios factores entre los que podrían destacar las posibles diferencias con respecto a la virulencia de la bacteria. En estos cuadros se pueden encontrar desde neumonías supurativas focales y difusas, hasta cuadros donde existen lesiones vasculares con trombosis y hemorragias en los que se puede observar la transformación de neutrófilos dando un aspecto arremolinado. "

Este aspecto arremolinado se cree que se debe al efecto tóxico de la leucotoxina que produce *Pasteurella haemolytica* debido a que dañan a las células fagocíticas, primer mecanismo de defensa contra infecciones respiratorias, la lisis de ésta célula conduce a la liberación de enzimas proteolíticas y mediadores del proceso inflamatorio, el efecto tóxico tiene repercusión también en la respuesta inmune, por el daño a macrófagos y linfocitos lo cual favorece entre otros mecanismos el establecimiento y diseminación de la bacteria.

Actualmente, en la patogénesis de la enfermedad existen múltiples interacciones hospedador-bacteria, que se inician con la inhalación del agente, la colonización nasofaríngea, la llegada al alveolo, la respuesta a la colonización y por último culmina con la evasión bacteriana a las defensas del hospedador; varios componentes

asociados a la pared celular como el lipopolisacárido, proteínas de membrana externa, material capsular, la leucotoxina, así como otros factores de virulencia tales como las fimbrias, proteínas reguladas por hierro (PRH), antígenos aglutinantes serotipo específico, neuraminidasa y glicoproteasa neutral, pueden contribuir a la presentación de la enfermedad. " " "

En descubrimientos recientes sobre la interacción *P. haemolytica*-hospedador se ha logrado entender y resolver algunas preguntas sobre las bases tempranas de la patogénesis de la pastereosis neumónica. Sin embargo los eventos en nasofaringe que permiten la proliferación de *P. haemolytica* son desconocidos. "

Estudios recientes sugieren que el estrés y las infecciones virales estimulan el incremento en el hospedador de la actividad de elastasa en la mucosa nasal, lo cual puede disminuir las concentraciones de fibronectina y el incremento en la adherencia de *P. haemolytica*. "

Adicionalmente, la neuraminidasa derivada de la *P. haemolytica* y la glicoproteasa pueden alterar la secreción salival mucosa o las glicoproteínas de superficie de las células, incrementando la adherencia de *P. haemolytica* al moco o al epitelio nasal. "

Las estructuras de superficie de *P. haemolytica* responsables de la adherencia son desconocidas. Las fimbrias han sido raramente encontradas en los aislamientos de *P. haemolytica*. Los

polisacáridos capsulares, el LPS, las proteínas de membrana externa y los antígenos aglutinantes serotipo-específico, podrían asumir el papel de adhesinas en ausencia de fimbrias. "

Una vez que *P. haemolytica* gana el acceso al alveolo pulmonar factores bacterianos estimulan una respuesta inflamatoria aguda. Estos factores bacterianos asociados con los del hospedador, inducen daño tisular localizado y estimulan una respuesta sistémica asociada con el proceso inflamatorio agudo.

La endotoxina y la leucotoxina son los factores de virulencia mejor caracterizados con respecto a sus efectos en el alveolo. La leucotoxina producto del crecimiento *in vitro* de *P. haemolytica* esta sumamente agregada y tiene baja actividad leucotóxica pero puede ser disgregada con albumina sérica bovina al 0.5% (BSA) resultando en un incremento de actividad, la disgregación realizada con BSA y el incremento de la actividad puede ocurrir durante la infección debido al mayor aporte sanguíneo (suero) al alveolo en los estadios tempranos de la respuesta inflamatoria."

La leucotoxina produce citólisis de neutrófilos y plaquetas, lo cual produce daño al alveolo debido a la liberación de enzimas lisosómicas y radicales de oxígeno libres. Aparte de la actividad citotóxica estudios recientes han demostrado que la leucotoxina modifica la función del neutrófilo."

Estas modificaciones incluyen aumento de la producción de mediadores de la inflamación como el leucotrieno B₄ y el ácido 5-hidroxi-eicosatetranoico. Estos cambios pueden amplificar la respuesta inflamatoria resultando en lesiones más severas o mejorando la bacteriolisis. Además las concentraciones sublépticas de leucotoxina inhiben la blastogénesis de linfocitos bovinos lo cual podría reducir las defensas inmunomediadas contra *P. haemolytica*."

Las actividades funcionales de la endotoxina de *P. haemolytica* han empezado a ser mejor entendidas en relación a su papel en la pasterelosis neumónica. Se ha demostrado que la endotoxina de *P. haemolytica* es directamente tóxica al endotelio por lo que puede incrementar la permeabilidad capilar a nivel alveolar. Recientemente se ha demostrado que la endotoxina daña el endotelio durante la estimulación del factor tumoral de necrosis (TNF) y por la producción de interleucina-1 por macrófagos alveolares, este efecto puede ser mitigado por suero inmune o por la presencia de neutrófilos. "

Los estudios sobre las consecuencias de la interacción entre neutrófilos, endotoxina de *P. haemolytica* y endotelio han resultado en datos contradictorios. Las futuras determinaciones del papel que juegan los factores de virulencia de *P. haemolytica* en la patogénesis de la pasterelosis neumónica, recaen en el desarrollo de cepas mutantes de la bacteria para la medición *in vitro* e *in*

vivo de su virulencia. En la actualidad el desarrollo de cepas mutantes está teniendo mucha relevancia para el estudio de varios factores de virulencia. El desarrollo de sistemas genéticos para el análisis de factores de virulencia en *P. haemolytica* ha sido lento, sin embargo, se han desarrollado algunos métodos para la introducción de plásmidos de DNA en *P. haemolytica* por electroporación y conjugación, con lo que se han construido una gran cantidad de cepas mutantes de *P. haemolytica*.^{3,18,19,17}

Se determinó recientemente que una cepa mutante, deficiente en leucotoxina induce lesiones en pulmón, ésta característica resalta la importancia de otros factores de virulencia en la patogénesis de la enfermedad. Esta cepa permite el estudio del mecanismo de interacción leucocito-*P. haemolytica* sin la complicación de la leucotoxina que induce daño celular, muerte e inactivación. Se construyeron mutantes de *P. haemolytica* que no sintetizan en alta proporción tres lipoproteínas de membrana. Estas lipoproteínas han mostrado homología con una lipoproteína de *H. influenzae* que mostró estar asociada con virulencia en un modelo de desafío en ratones.¹⁶

La caracterización de PRH localizadas en la membrana externa y en el espacio periplásmico, identifica bandas con aparente peso molecular de 35, 70 y 100 KDA. Estudios más a fondo revelaron que la banda de 70 KDA es en realidad una mezcla de tres proteínas distintas, una de las cuales contiene un epítipo serotipo-específico y no es regulada por hierro y las otras dos si lo son.¹⁶

También existe la posibilidad de que existan diferencias en cuanto a factores de virulencia entre las cepas de diversos cuadros neumónicos, así como de cepas provenientes de animales sanos. Entre estos factores de virulencia podrían mencionarse, la capacidad de producir leucotoxina, la presencia de adhesinas, el serotipo y la capacidad inmunogénica entre otros, permitiendo la colonización, replicación del agente y la presentación de cuadros neumónicos."

HIPOTESIS.

Las propiedades patogénicas de *P. haemolytica* podrían ser diferentes dependiendo del origen del aislamiento y por consiguiente su capacidad de producción de leucotoxina. La cual podría ser mayor en bacterias que se asocian a lesiones neumónicas de mayor severidad.

OBJETIVOS.

- 1.-Determinar la capacidad de producción de leucotoxina en diferentes aislamientos de *Pasteurella haemolytica* obtenidas a partir de ovinos con neumonía y microbiota normal.
- 2.-Determinar los serotipos más comunes de *Pasteurella haemolytica* de microbiota normal y pulmones neumónicos.

MATERIALES Y METODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO. Los aislamientos de *Pasteurella haemolytica* fueron proporcionados en el laboratorio de bacteriología del INIFAP. Estos aislamientos se obtuvieron en un trabajo previo de muestras de pulmón de corderos muertos por neumonía y de cavidad nasal de animales clínicamente sanos.

El muestreo realizado para obtener los aislamientos de *P. haemolytica* de animales muertos por neumonía se realizó en cinco explotaciones comerciales localizadas en Teoloyucan, Estado de México. La localidad de Parres y Ajusco, Delegación de Tlalpan, D.F. y Rio frío, Estado de México. Con una población total estimada de 400 corderos. De ésta población se obtuvieron muestras de 147 animales clínicamente sanos.

Los aislamientos de pulmones con lesiones neumónicas de animales sacrificados en rastro se obtuvieron en los rastros Municipales de Cuautitlán, Tlanepantla y Muñora en el Estado de México.

Se obtuvieron 7 aislamientos de pulmones neumónicos, 25 aislamientos de pulmones de animales sacrificados en rastro y 24 aislamientos de animales sanos, los cuales fueron evaluados para determinar la capacidad producción de leucotoxina (CPL).

CINETICA DE PRODUCCION DE LEUCOTOXINA DE *P. haemolytica*. Se cultivaron los aislamientos de *P. haemolytica* en agar sangre y, se incubaron a una temperatura de 37°C por 18 horas. Se procedió a cosechar en viales los cuales contenían 10 ml de solución salina amortiguada (SSA), se estandarizó a 0.540 de densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Posteriormente en viales por duplicado conteniendo 20 ml de medio de RMPI 1640 (Sigma Chemical Co.) adicionado con 7% de suero bovino, se colocaron 2.0 ml de la solución estandarizada de bacterias, identificando cada vial con el número de aislamiento. Se procedió a introducir los viales en baño maría a 37°C con movimientos constantes a una velocidad de 50 movimientos por minuto; durante seis horas. A intervalos de una hora se obtuvo una alícuota de un mililitro de cada vial depositándolo en microtubos cónicos de plástico (tubos Eppendorff) los cuales se identificaron con el número de aislamiento y la hora en que fue tomada la muestra, este muestreo se siguió hasta completar las 6 horas de incubación (tiempo que requiere la bacteria para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento). Los microtubos cónicos de plástico que contenían las muestras obtenidas cada hora se sometieron a congelación hasta su evaluación. La evaluación de leucotoxina se efectuó empleando un ensayo simple visual, desarrollado por Gentry."

ENSAYO VISUAL SIMPLE PARA LA DETERMINACION DE LEUCOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica*. Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tiene la leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* para lisar a las células "blanco", que en este caso fueron leucocitos de sangre periférica de bovino obtenidas mediante choque hipotónico de sangre completa." La prueba consistió en utilizar placas de microtitulación de 96 pozos en los cuales se adicionaron 100 microlitros de medio de RPMI 1640 a cada pozo, posteriormente en la fila A de cada placa se adicionaron 100 microlitros del sobrenadante de cultivo de cada muestra obtenida de las distintas horas de muestreo de los diferentes aislamientos; a partir de la fila A de cada placa, se procedió a hacer diluciones dobles hasta la fila H, enseguida se añadió la suspensión de leucocitos a una concentración de 1×10^7 cél/ml y se incubó durante una hora a 37 °C. Al finalizar este período, las placas se centrifugaron a 800 X G por 5 minutos, a cada pozo se le adicionó SSA formalinizada al 10%, y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se tiñeron las placas con una solución de cristal violeta al 1.0% durante 10 minutos, lavándose finalmente éstas con agua corriente." Si se observaba un fondo azul en los pozos indicaba la presencia de células teñidas y por lo tanto un resultado negativo a la existencia de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*.

Un fondo claro indicaba la presencia de citotoxina libre ejerciendo su efecto de lisis sobre las células "blanco" y eliminando el sustrato celular a teñir.

CHOQUE HIPOTONICO PARA LA OBTENCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA. Se tomaron muestras de sangre periférica bovina con tubos vacutainer los cuales contenían heparina como anticoagulante. La sangre se depositó en un matraz, al cual se le adicionó la misma cantidad de agua destilada por 30 segundos, provocando el choque hipotónico que producía la lisis de los eritrocitos. Posteriormente se le agregó la misma cantidad de SSA concentrada 2X la cual detenía la lisis eritrocítica "

Esto se centrifugó a 800X G por cinco minutos, todo este procedimiento se realizó hasta obtener el paquete globular blanco libre de eritrocitos, se estandarizó la concentración a 5×10^6 células por ml adicionando RMPI 1640."

ANALISIS ESTADISTICO. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza completamente al azar con rompimiento en tiempo. Un valor de $P < 0.05$ se consideró positivo.

RESULTADOS.

Se obtuvieron 57 aislamientos de *P. haemolytica* de diferentes orígenes, Cuadro 1. A partir de microbiota normal de animales clínicamente sanos se recuperaron 24 aislamientos de ésta bacteria representando el 16.21% de los diferentes microorganismos aislados del pasaje nasal ; otras bacterias aisladas fueron *P. multocida*, *Neisseria spp.*, y enterobacterias como *E. coli*, *Salmonella arizonae* y *Citrobacter spp.* También se efectuó el aislamiento de una *P. haemolytica* biotipo T serotipo 10, de éstos animales. De los 24 aislamientos el 41.66% perteneció al serotipo A2; el 12.5% al serotipo A1; el 20.84% a otros serotipos y el 25% no fue tipificable. De animales muertos por diferentes causas, donde el cuadro respiratorio fue el factor más importante de éstas muertes, se lograron 7 aislamientos (9.09%), de éstos, el serotipo que con mayor frecuencia se aisló fue el A1 y el A5 con 42.85% cada uno y una cepa no tipificada. De pulmones de animales sacrificados en rastro se aisló *P. haemolytica* en 26 casos (6.91%) los serotipos más comunes fueron el A1, A2 y A9 con 19.23%, 30.76% y 26.92% respectivamente.

La cinética de producción de leucotoxina para los diferentes aislamientos de *P. haemolytica* se muestra en la gráfica 1, la cual representa el valor promedio de los diferentes serotipos obtenidos en cada grupo. Para su mejor análisis los datos obtenidos se transformaron a logaritmo base 2. Los aislamientos que mayor capacidad de producción de leucotoxina (CPL) tuvieron, fueron los

obtenidos de animales muertos por neumonía y la menor producción en los aislamientos obtenidos de microbiota normal; se observó un comportamiento de cinética de producción similar entre los diferentes grupos, encontrándose el mayor efecto citotóxico a la cuarta hora de incubación, siendo más alto para aislamientos obtenidos de neumonías y menor en los de microbiota normal ($P < 0.05$), después de este tiempo el efecto disminuye en los tres grupos.

Los datos se graficaron por serotipo y por origen de los aislamientos. La gráfica 2 muestra la CPL de 3 diferentes serotipos 1, 2 y 9 de *P. haemolytica* obtenidos de microbiota normal. Sólo se graficaron los datos de éstos serotipos porque fueron los que con mayor frecuencia se aislaron en éste grupo de animales. Como puede observarse el serotipo 9 es el que presenta una mayor CPL ($P < 0.05$), alcanzando los títulos más altos a la hora 1 y 5 con un posterior descenso llegando los títulos a 0. En este grupo los serotipos 1 y 2 alcanzan su título más alto entre la hora 4 y 5, disminuyendo su producción después de éste período pero sin llegar a 0. En la hora 5 de incubación los serotipos 1 y 9 mostraron los títulos más altos con respecto al serotipo 2 ($P < 0.05$). Es conveniente señalar que el serotipo 2 comienza su producción hasta la segunda hora de incubación.

La gráfica 3 muestra la CPL de los serotipos 1 y 5 de *P. haemolytica* obtenidos del grupo de animales donde la principal causa de muerte fue la neumonía. El serotipo 5 es el que presenta mayor CPL teniendo su mayor efecto citotóxico a la cuarta hora y en las horas posteriores sus títulos descienden paulatinamente. El serotipo 1 presenta un comportamiento muy similar al serotipo 5 sin embargo, su producción fue menor ($P < 0.05$). Estos serotipos fueron los que con mayor frecuencia se aislaron en este grupo de animales.

La CPL de los serotipos 1, 2, 5 y 9 de *P. haemolytica* obtenidos de pulmones con lesiones neumónicas de animales sacrificados en rastro se puede observar en la gráfica 4. El serotipo que presentó mayor producción de leucotoxina fue el serotipo 9 ($P < 0.05$), alcanzando su mayor título a la cuarta hora y manteniéndolo hasta la quinta hora, descendiendo éstos títulos en la sexta hora. El serotipo 5 tuvo menor capacidad de producción, pero su título más alto se alcanzó a la tercera hora, pero fue más bajo que el del serotipo A9. Los serotipos 1 y 2 aislados en éste grupo no tuvieron una producción significativa durante el tiempo de incubación.

La gráfica 5 muestra la CPL de los serotipos A1, donde se observa que los aislamientos del serotipo A1 que mayor producción tienen son los de pulmones de animales muertos por cuadros neumónicos en los que su mayor efecto citotóxico se presentó a la cuarta hora de incubación con un súbito descenso de los títulos. Los

aislamientos de éste serotipo obtenidos de pulmones de animales sacrificados en rastro y de microbiota normal tuvieron un comportamiento diferente al observado en los aislamientos de origen neumónico, su mayor efecto citotóxico se presentó en la quinta hora de incubación y fue menor que la de aislamientos de origen neumónico ($P < 0.05$).

La CPL de aislamientos del serotipo A2 de diferente origen se muestra en la gráfica 6, en donde se puede observar que la producción de leucotoxina de los aislamientos de microbiota normal comienza a partir de la segunda hora mientras que en los aislamientos de pulmones neumónicos de animales sacrificados en rastro se detecta un efecto citotóxico a partir de la primera hora, alcanzando incluso los títulos más altos desde la segunda hora y manteniéndose hasta la sexta hora, en tanto que los aislamientos de microbiota normal alcanzaron su mayor producción a la cuarta hora.

La gráfica 7 muestra el comportamiento de los serotipos A5 los cuales se aislaron únicamente a partir de pulmones neumónicos de rastro y de pulmones de animales muertos por neumonía. En estos últimos se observó una mayor producción de leucotoxina a la cuarta hora, siendo esta más alta en este grupo que en la de aislamientos de pulmones neumónicos de rastro en los cuales la producción fue más alta a la tercera hora, sin alcanzar el nivel de los aislamientos del grupo anterior.

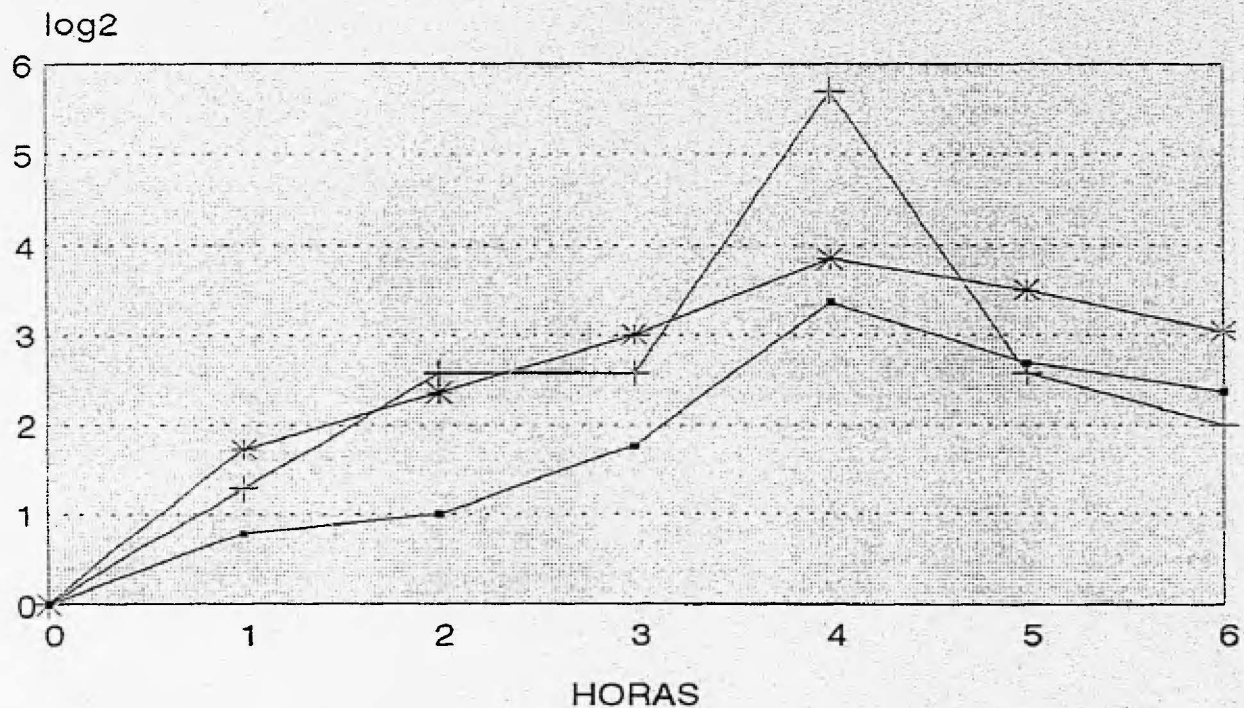
En la gráfica 8 se muestra la cinética de producción de aislamientos correspondientes al serotipo 9, los cuales se recuperaron únicamente de microbiota normal y en los pulmones neumónicos obtenidos de rastro, la mayor CPL se observó en los aislamientos de este último grupo a la cuarta y quinta hora con un rápido decremento de sus títulos a la sexta hora de incubación, la cinética de producción para los aislamientos de microbiota normal muestran un comportamiento irregular durante todo el período de incubación; sin embargo, se observa una producción alta en la primera hora, disminuyendo en las siguientes horas, para incrementarse nuevamente a la quinta hora y descender bruscamente en la sexta hora.

Cuadro. 1

Porcentaje de aislamientos de diferentes serotipos de *Pasteurella haemolytica* y su origen.

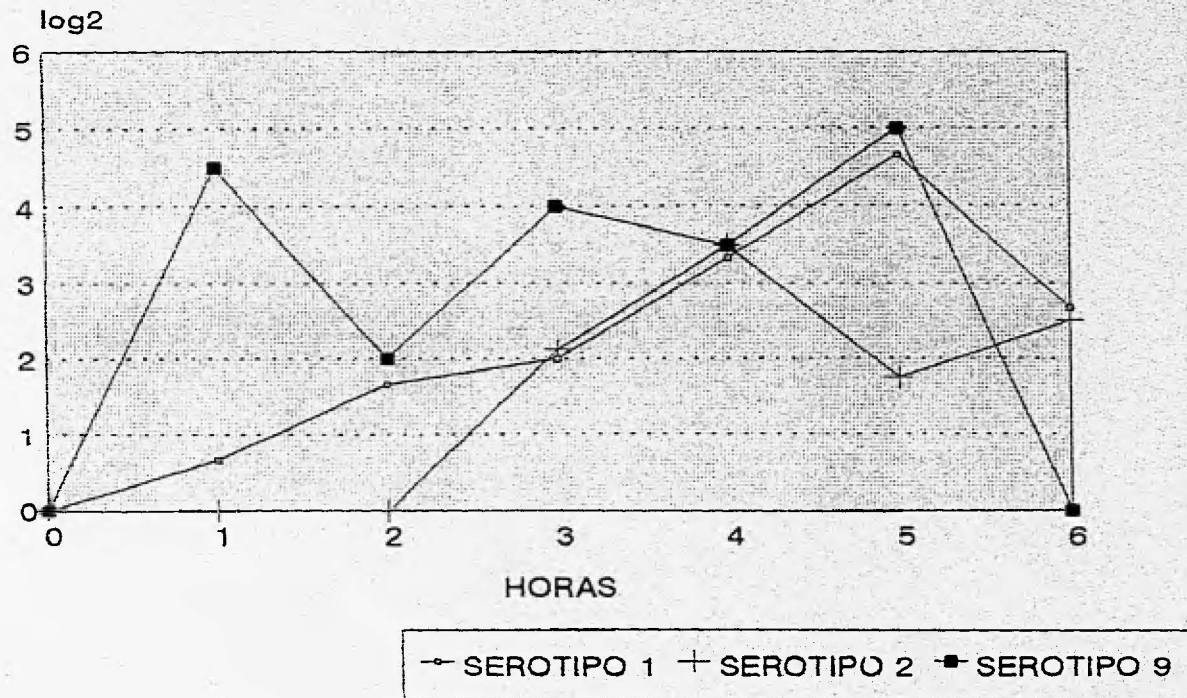
ORIGEN	No. DE AISLAMIENTOS	SEROTIPOS
microbiota normal	24 (42.11%)	A1 (12.5%) A2 (41.67%) NT (25%) Otros (20.84%)
rastro	26 (45.61%)	A1 (19.24%) A2 (30.77%) A9 (23.07%) NT (19.24%) Otros (7.66%)
neumonías	7 (12.28%)	A1 (42.85%) A5 (42.85%) NT (14.30)

NT = No tipificable.

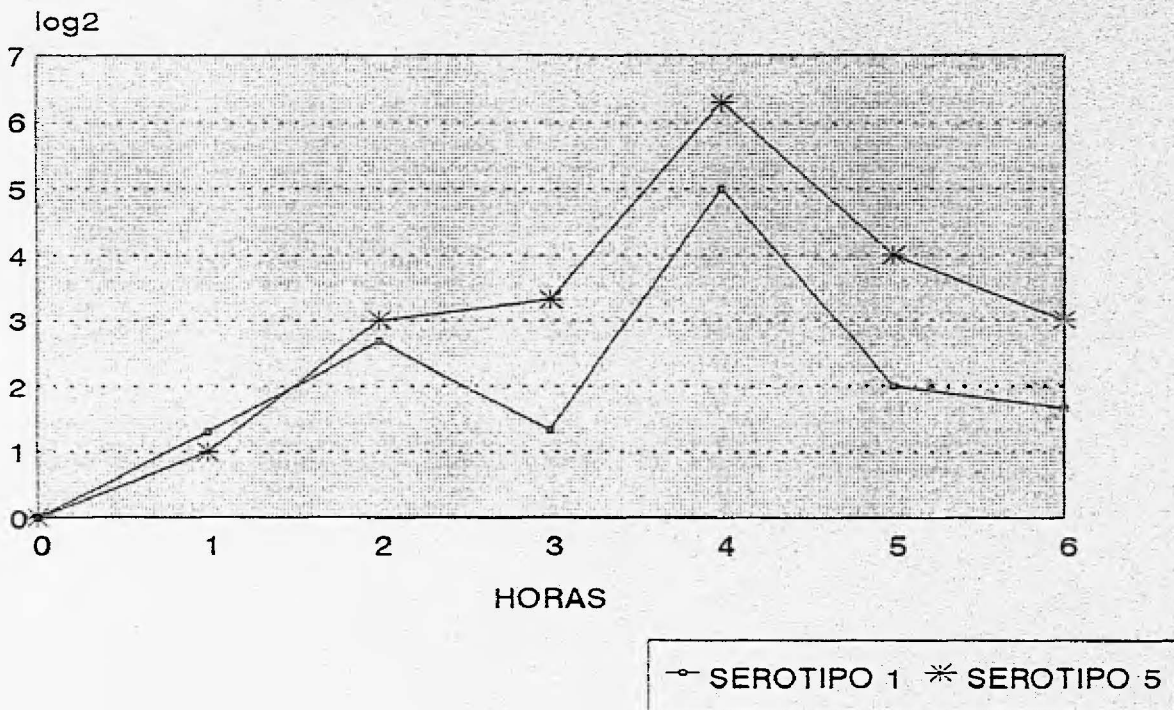
Gráfica 1. Producción de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* de diferentes orígenes

■ MICROBIOTA NORMAL + NEUMONICOS * RASTRO

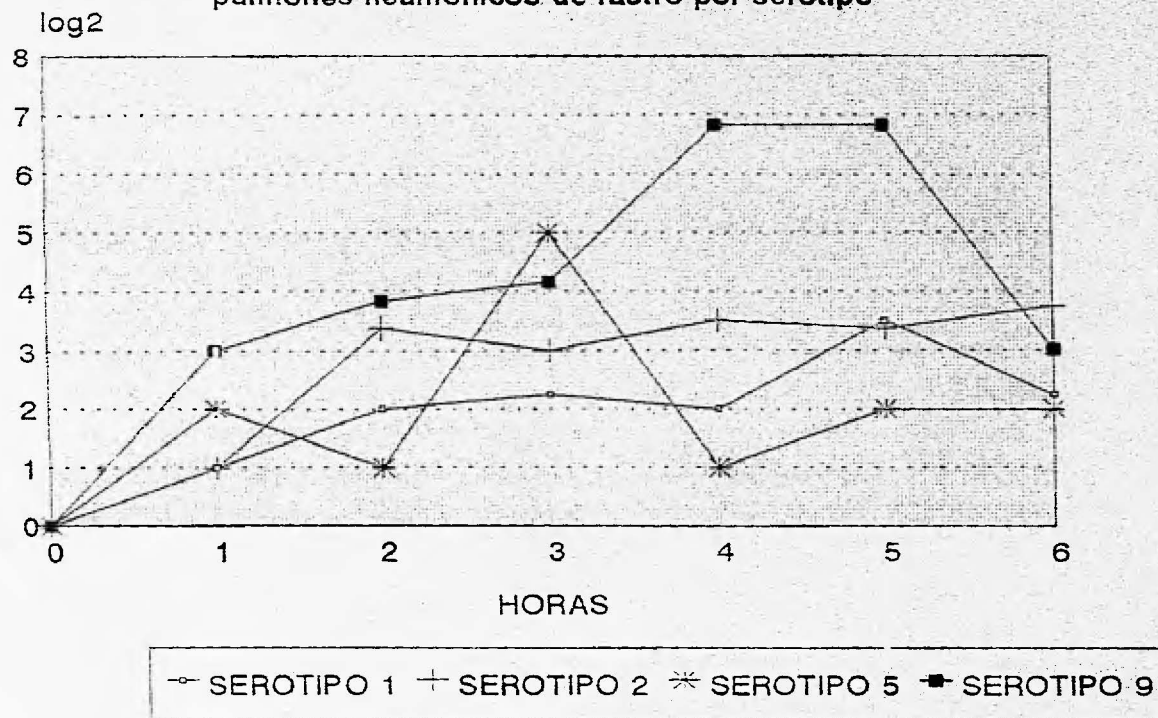
Gráfica 2. Producción de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* de microbiota normal por serotipos



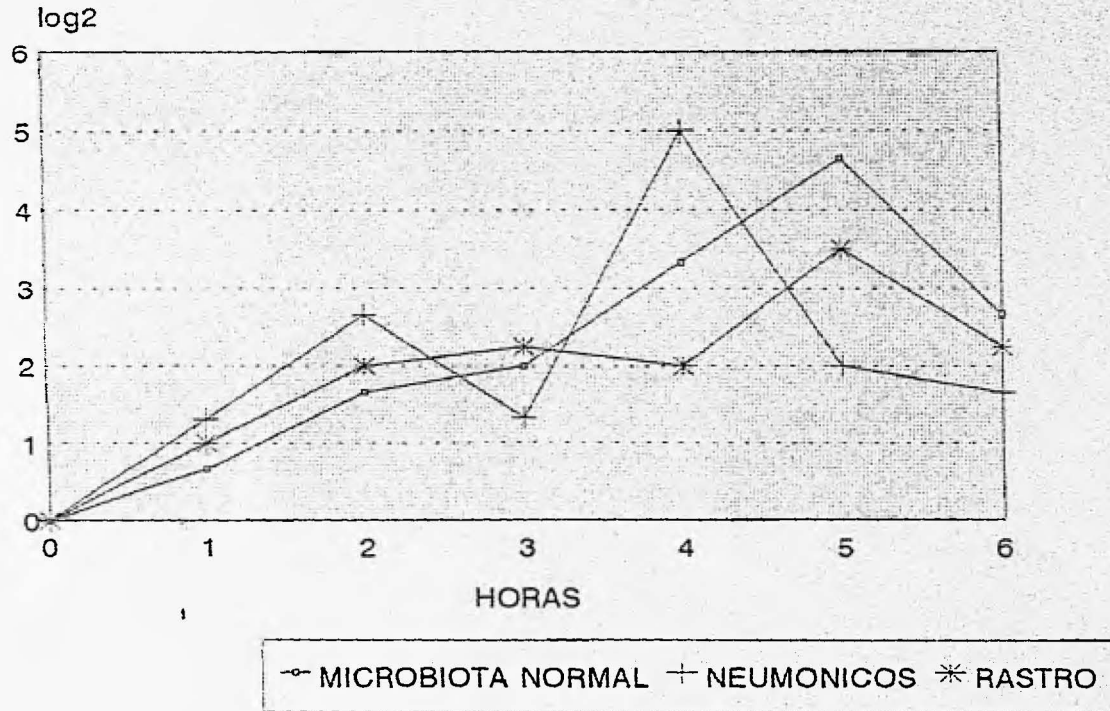
Gráfica 3. Producción de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* de pulmones neumónicos por serotipo



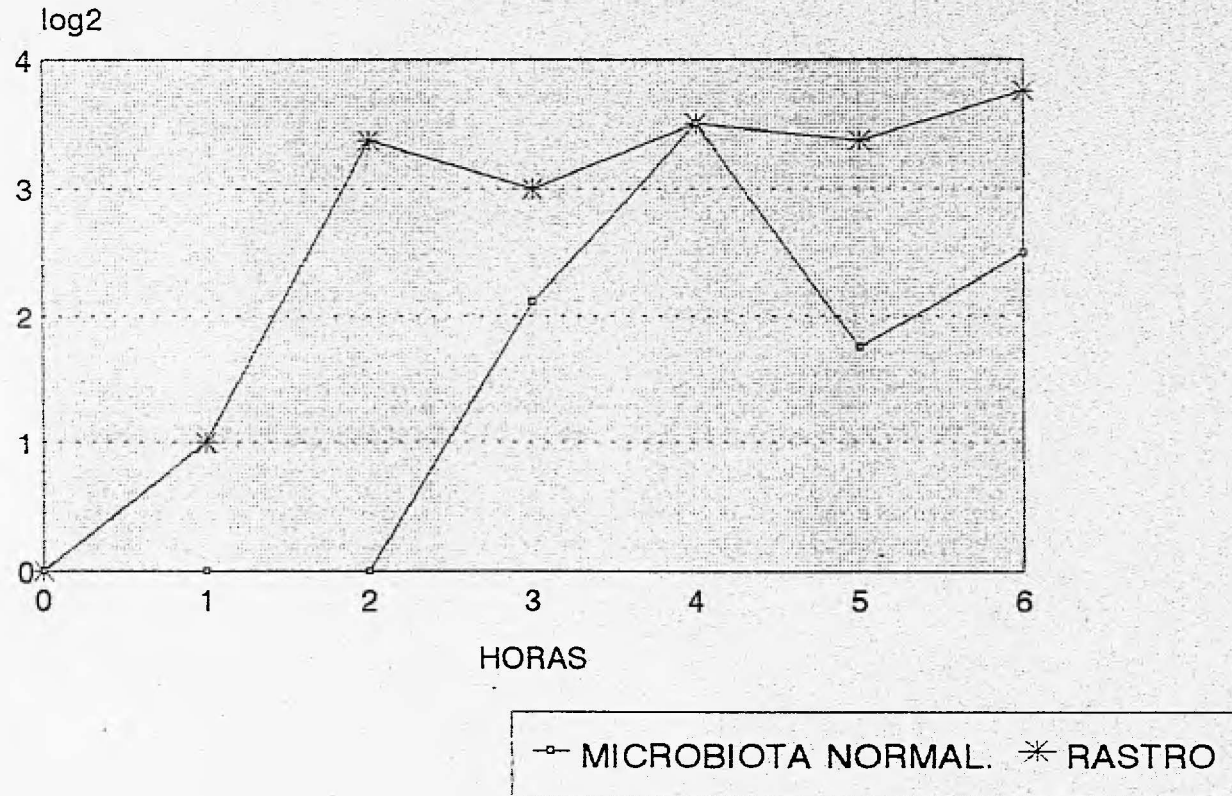
Gráfica 4. Producción de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* de pulmones neumónicos de rastro por serotipo



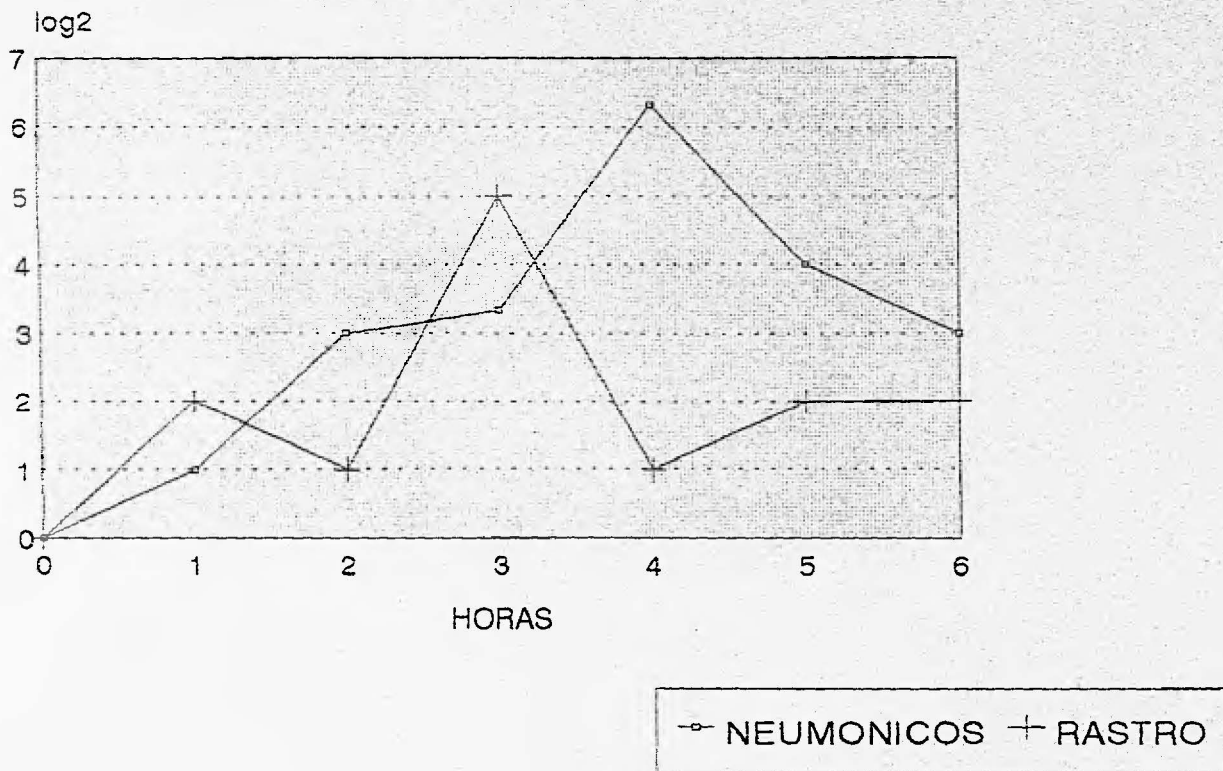
Gráfica 5. Producción de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* serotipo AI de diferentes orígenes



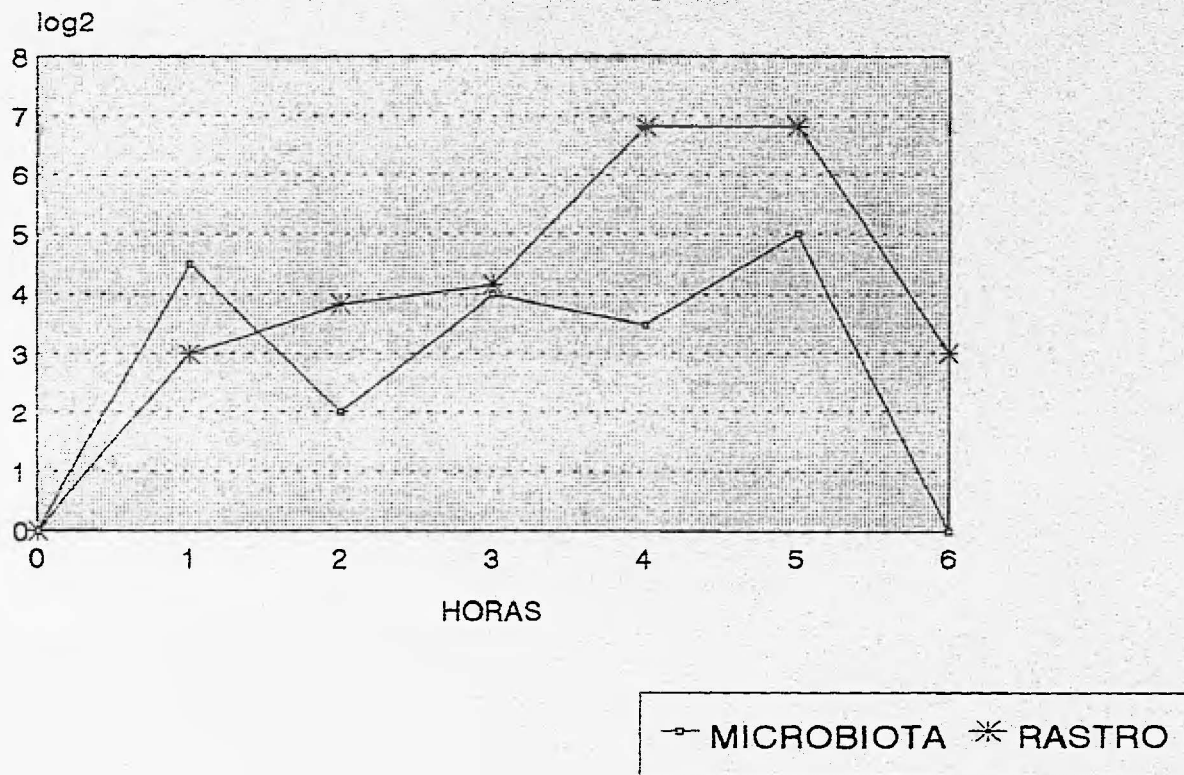
Gráfica 6. Producción de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* serotipo A2 de diferentes orígenes



Gráfica 7. Producción de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* serotipo A5 de diferentes orígenes



Gráfica 8. Producción de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* serotipo A9 de diferentes orígenes



Discusión

En el presente trabajo se observó que existen diferencias en cuanto a la capacidad de producción de leucotoxina entre las cepas obtenidas de diversos cuadros neumónicos, así como de cepas provenientes de animales sanos. Se encontró que existe una mayor producción en los aislamientos de pulmones de animales muertos por neumonía aguda, seguida de los aislamientos de pulmones de animales sacrificados en rastro, los cuales pueden estar afectados por neumonías menos severas o crónicas que no son de consecuencias fatales para el animal; la menor producción se observó en aislamientos de microbiota normal.

Por serotipos se encontró que los aislamientos del serotipo A1 y A5 obtenidos de neumonías agudas presentaron una mayor actividad en relación con los otros aislamientos, siendo ésta más alta para el serotipo A5. Un análisis mayor para los restantes serotipos no pudo realizarse con todos los grupos, debido a que no se efectuaron aislamientos de esos serotipos. Para aislamientos obtenidos de neumonías crónicas el serotipo A9 tuvo la producción más alta, seguido de los serotipos A5, A2 y A1. En los aislamientos de microbiota el serotipo A9 también fue el que presentó un mayor efecto citotóxico seguido del A1 y A2, estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos ", sobre la comparación de las propiedades tóxicas de diferentes serotipos aislados de bovino, donde se muestra que el serotipo que mayor producción de

leucotoxina presentó fue el serotipo A9 con títulos hasta 2 veces más altos que los producidos, por los serotipos A1, A2, A5 y A6 y que el serotipo que presentó menor actividad fue el serotipo A2.

Estas diferencias parecen ser debidas a la tasa de crecimiento entre serotipos y a la habilidad para mantener la fase logarítmica de crecimiento. Se ha informado que la viabilidad y perfil de toxicidad para los serotipos A1 y A2 son parecidas, excepto que el serotipo A2 exhibe una fase de adaptación más prolongada, lo cual podría explicar la baja toxicidad de los sobrenadantes de cultivo obtenidos en las dos primeras horas comparada con los sobrenadantes del serotipo A1. Resultados similares para los aislamientos de este serotipo se observaron en el presente trabajo. Gentry también sugiere que la alta producción del serotipo A9 parece deberse a que la leucotoxina producida por este serotipo es más estable que la de otros serotipos a pesar de que las cepas muestran un decremento rápido en la viabilidad.

La diferente capacidad de producción de leucotoxina observada en los aislamientos obtenidos de neumonías y de microbiota normal puede deberse a diferencias entre la adaptabilidad de los aislamientos *in vitro*, principalmente los obtenidos de cavidad nasofaríngea donde las condiciones fisiológicas y nutricionales son diferentes a las de aparato respiratorio bajo; quizás estas condiciones no permitan la expresión de factores de virulencia, como la leucotoxinas en grandes cantidades por ausencia de

inductores *in situ* hasta ahora desconocidos, o bien tengan tasas de crecimiento más bajas que los aislamientos obtenidos de neumonías.

Las proteínas con actividad tóxica producidas por los diferentes serotipos de *P. haemolytica* están inmunológica y funcionalmente relacionadas. Por análisis de souther-blot de los determinantes LKT, se encontró que existen variaciones en los genes de la leucotoxina de los 16 diferentes serotipos, la relevancia de éstas variaciones y su importancia clínica no están determinadas;^{10,11} podría suponerse que habría diferencias en la capacidad para producir la enfermedad, sin embargo, algunos autores han realizado estudios comparativos entre diferentes serotipos evaluando sus propiedades de capsulación, producción de leucotoxina *in vitro*, propiedades antigénicas y su capacidad potencial para producir la enfermedad experimentalmente. Estos autores concluyen que no existen diferencias significativas en el potencial patógeno de sus cepas, a pesar de haber diferencias en su toxicidad.^{11,12}

En este trabajo se observó que las cepas del serotipo A1 independientemente de su origen mostraron menor producción de leucotoxina que los serotipos A9 y A5; considerando que el serotipo A1 es el principal serotipo aislado de neumonías en bovinos y uno de los más frecuentes en ovinos, resulta sorprendente que no exhiba una habilidad tóxica mayor; este hecho pone de manifiesto la importancia de otros supuestos factores de virulencia de la bacteria, incluyendo cápsula, proteínas de membrana externa,

lipopolisacárido, sialoglicoproteasa y neuraminidasa en el desarrollo de la enfermedad.

La participación de la leucotoxina y su importancia está ampliamente documentada. Su papel es la destrucción de leucocitos en el lugar de la infección, lo que provoca una reducción en la capacidad inmunológica del animal; además, con la lisis de éstas células se liberan enzimas proteolíticas en el tejido pulmonar, que contribuyen con la severa necrosis que se observa en las infecciones por *P. haemolytica*.^{11,19,20,21,22}

El desarrollo de mutantes no productoras de leucotoxina permitió definir el significado de éste factor de virulencia en la enfermedad; en experimentos de desafío se observó que los animales inoculados con la cepa mutante produjeron lesiones menos severas; la mortalidad también se redujo significativamente en comparación con la cepa de campo.^{23,24,25}

Estos estudios de desafío, realizados con diferentes serotipos, con cepas mutantes y de campo de *P. haemolytica*, muestran la relevancia de la leucotoxina en la patogénesis de la infección, e indican que el potencial patógeno que tienen los diferentes serotipos parece ser independiente de la cantidad de leucotoxina que producen *in vitro*; aunque su presencia para el establecimiento y desarrollo de la infección es fundamental, queda por determinar el posible potencial patógeno de los aislamientos de microbiota

normal y las condiciones que permiten romper el equilibrio entre bacteria-hospedador que favorecen la adaptación, proliferación e invasividad de la bacteria y que promueven una mayor producción de leucotoxina.

Finalmente la producción tardía de leucotoxina en aislamientos de microbiota normal comparada con la producción inmediata de aislamientos provenientes de pulmones neumónicos puede deberse a que existen algunas diferencias en cuanto a propiedades patogénicas que favorezcan una mayor adaptabilidad de la bacteria en el animal y a cultivos *in vitro* o bien puede ser debido a la expresión genética que tengan éstas en un proceso activo para, producir la leucotoxina inmediatamente y el cual no esté manifestándose en los aislamientos de microbiota normal.

Es importante mencionar que en cada uno los aislamientos de exudado nasal y de pulmones neumónicos se obtuvo un aislamiento del biotipo T serotipo 10. El aislamiento del biotipo T a partir de microbiota normal representa el primero de su tipo en México. Los biotipo T de *P. haemolytica* son poco frecuentes como parte de la microbiota normal y es raro su aislamiento de animales que presentan cuadro neumónico ". Este hecho puede deberse, por lo menos en México, a que efectivamente sean poco frecuentes, a la falta de una metodología diagnóstica adecuada, a no considerar a *P. haemolytica* dentro de los diagnósticos diferenciales de cuadros septicémicos o simplemente a la falta de interés por ésta bacteria;

también puede deberse a que éste biotipo únicamente se ha aislado de animales destinados a la engorda y en México este tipo de explotaciones no son muy comunes.

Conclusiones.

De los 57 aislamientos de *P. haemolytica* obtenidos de los diferentes orígenes se observaron diferencias en cuanto a la capacidad de producción de leucotoxina, siendo directamente proporcional al origen y serotipo de la bacteria. Los aislamientos que tuvieron mayor producción de leucotoxina fueron los obtenidos de animales muertos por neumonía y la menor producción en los aislamientos obtenidos de microbiota normal.

Los serotipos que únicamente se obtuvieron. Y con una mayor frecuencia, en aislamientos de microbiota normal fueron los A2 y A9 en donde el serotipo que mayor efecto citotóxico tuvo fue el serotipo A9, siendo su producción irregular durante todo el proceso de incubación y con un posterior descenso a la 6a hora llegando a niveles de 0. Aquí cabe resaltar que el serotipo A2 de este grupo comienza su producción hasta la segunda hora de incubación.

En aislamientos de pulmones neumónicos se obtuvieron únicamente a los serotipos, A1 y A5, en donde el que presenta un mayor efecto citotóxico es este último. El serotipo A5 también fue aislado de pulmones de animales sacrificados en rastro pero sin llegar a alcanzar los mismos títulos de producción del primer grupo.

Los serotipos A1, A2, A5 y A9 fueron aislados de muestras de pulmones de animales sacrificados en rastro; en este grupo el serotipo A9 fue el que mayor producción de leucotoxina tuvo, los demás serotipos no alcanzaron niveles significativos durante su periodo de incubación a excepción del serotipo A5 que en la 3a hora alcanzó un título alto pero sin llegar a alcanzar al serotipo A9.

LITERATURA CITADA:

- 1.-Aluja A.S.; Necropsias en animales domésticos. 2da ed. C.E.C.S.A México, p. 31-45. 1986.
- 2.-Aley, M.R. and Clarke, J.L.: The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. *N.Z. Vet. J.*, p. 25-200 (1977).
- 3.-Alley, M.R., Quinlan, J.R. and Clarke, J.R.: The bacterial flora of the respiratory tract of normal and pneumonic sheep. *N.Z. vet. j.*, 23:113-118 (1975)
- 4.-Argueta, G. J., Mercado, P. M., Trigo, T. F. J: Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. *Vet. Méx.*, 19: 93-97. (1988).
- 5.-Ayala, M.A.: Incidencia y prevalencia de neumonias en becerros Holstein-Friesian en etapas de lactancia y destete durante un año en un centro de recría. Tesis de licenciatura. Fac. de Est. Sup. Cuautitlan. Universidad Nacional Autonoma de México. México D.F. 1977
- 6.-Biberstein, E.L.: Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. En: Bergan, T. y Norris, J.: *Methods in Microbiology*. Academic Press. Inc. New York, U.S.A. 10: 253 (1978).
- 7.-Blanco, F. J., Trigo, F. J., Jaramillo, L., Aguilar, F., Tapia, G. y Suárez, F: Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet. Méx.* 24: 2 (1993).
- 8.-Blood, D.C., Henderson, J.A. y Rodostitis, O. M.: *Medicina Veterinaria*. 5a. ed. Interamericana. p. 230. 1985.
- 9.-Briggs, R. E., Frank, G. H. Increased elastase activity in nasal mucus associated with nasal colonization by *Pasteurella haemolytica* in infectious bovine rhinotracheitis virus-infected calves. *Vet. Res*, 53: 631-635, (1992).
- 10.-Burrows, L.L., Olah, W.E., Reggie, Y.C.: Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect. Immun.*, 61:5001-5007 (1993).
- 11.-Clinkenbeard, K. D., Mosier, D.a. y Confer, A. D. 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect immun* 57:420

- 12.-Colín, F. R., Jaramillo, M. L., Aguilar, R. F., Trigo, J. F., Merino, M. M.: Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 29: 231-234, 1987.
- 13.-Colin, R., Jaramillo, M. L., Aguilar, R. F., Trigo, T. F. J. y Merino, M. M.: Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev. Lat-Amer. de Microbiol.*, 29:231 (1981).
- 14.-Confer, A. W., Panciera, R. J. and Mosier, D. A.: Immunity to *Pasteurella haemolytica*. *J.A.V.M.A.*, 193: 1308-1316 (1985).
- 15.-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.*, 47:1853 (1986).
- 16.-Confer, A. W., 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)
- 17.-Confer AW, Paciera RJ, Monsier DA. 1985. Immunity to *Pasteurella haemolytica*. *J.A.V.M.A.* 193: 1308-1316.
- 18.-Confer, A.W., Clinkenbeard, K.D., Murphy, G.L., : Pathogenesis of *Pasteurella haemolytica* in cattle an analysis of current knowledge and future approaches., OK 74078. USA. (1994).
- 19.-Colon, P., Gervais, M., Chaudhari, S., and Colon, J., Effects of *Pasteurella haemolytica* Leukotoxic Culture Supernatant on Bovine Neutrophil Aggregation., *Vet Res* 56: 199-203. 1992.
- 20.-Clinkenbeard, K. D., Clinkenbeard, P. A., Waurzyniak, B. J., Chaotropic agents cause disaggregation and enhanced activity of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin., *Vet, Microbiol*, 45: 201-209 :1995.
- 21.-Cruz, W. T., Young, r., Chang, y. f., and Struck, D. K.: Deletion analysis resolves cell-binding and lytic domains of the *Pasteurella leukotoxin*. *Mol, Microbiol*, 4 :11, 1933-1939.
- 22.-Chidambaram, M., Sharma, B., Petras, S.F., Reese. C.P., Froshauser S., Weinstock. G.M., Isolation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infect. Immun.*, 63:1027-1032 (1995).
- 23.-Chang, Y., Young, R., Post, D., and Struck, D. K., Identification and Characterization of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin., *Infec, Immunity*, 55: 2348-2354: (1987).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

24.-Davies, D. H., Dungworth, D. L., Humpreys, S. and Johnson, A. J.: Concurrent infection of lambs with parainfluenza virus type 3 and *Pasteurella haemolytica*. *N. Z. Vet. J.*, 25 : 263 (1977).

25.-Davies, D.H., Herceg, M. and Thurley, D.C.: Experimental infection of lambs with an adenovirus followed by *Pasteurella haemolytica*. *Vet. Microbiol.*, 7:369-381 (1982).

26.-Dereck, A. M., Simons, K. R., Confer, A. W., Panciera, R. J. and Clinkenbeard, K. D.: *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. *Infect. Immun.*, 572: 711 (1989).

27.-Dereck AM, Simons KR, Cofer AW, Panciera RJ, and Clinkenbeard KD, 1989. *Pasteurella haemolytica*. Antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. *Infect Immun.* 572: 711-716.

28.-Evermann, J.F., Liggitt, H.D., Parisch, S.M., Ward, S.G.S. and Leamaster, B.R.: Properties of respiratory syncytial virus isolated from a sheep with rhinitis. *Am. J. vet. Res.*, 46:947-951 (1985).

29.-Donachie, W. Vaccine development against *Pasteurella haemolytica* infections in shepp, Gilmerton, Edinburgo EH 177JH; Scotland, (1994).

30.-Franck, G. H. and Wessman, G. E.: Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, 7: 142 (1978).

31.-Gentry, M.J., Srikumarant, S. : Neutralizing monoclonal antibodies to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin affinity-purify the toxin from crude culture supernatants. *Microbiol. Pathog.*, 10:411-417 (1991)

32.-Gentry, M. L.; Confer, A.W.; y Kreps, J. A.; 1985. Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. *J. Clin. Microbiol.*; 22 : 968.

33.-Gentry, M. J., Confer, A. W. and Holland, S. G., Comparison of the Toxic and Antigenic Properties of Single Bovine Isolates of *Pasteurella haemolytica* Representing Five Serotypes and an Untypable strain. *Vet Microbiol*, 16: 351-367 (1988).

34.-Gilmour, N. J. L. Thompson, D. A. y Fraser J. 1974. The recovery of *Pasteurella haemolytica* from the tonsils of adult sheep *Res. Vet. Sci*; 17 : 41.

35.-Gilmour, N.J.L.: Pasteurellosis in shepp. *Vet Annu.*, 20.234-240 (1980).

36.-Gilmour, J.S., Jones, G.E., Rae, A.G., Quirie, M.: Comparasion of single strain of four serotypes Of *Pasteurella haemolytica* biotype A in experimental pneumonia of sheep. *Res. Vet. Sci.*, 40:136-137 (1986).

37.-Handy, A. H. y Trapp, A. L. 1967 Investigation of nasamicroflora of feed lot calves before and after weaning. *Am. J. Vet. Res*; 28: 1019.

38.-Highlander, S. K., Wickersham, E. A., Garza, O., and George, M. W., Expression of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin Is Inhibited by a Locus That Encodes an ATP-Binding Cassette Homolog. *Infect. Immun.* 61: 3942-3951 (1993).

39.- Highlander, S. K., Engler, M. J., and Weinstock, G. M., Secretion and Expression of the *Pasteurella haemolytica* Leucotoxin. *Am. J. Microbiol.*, 172: 2343-2350 (1990)

40.-Hore, D.E.: Isolation of ovine strains of parainfluenza virus serologically related to type 3. *Vet. Rec.*, 79:466-467 (1966).

41.-Jaramillo, L., Aguilar, F., Merino, M., Trigo, F.J. y Martínez, H.A.: Serotipos de *Pasteurella haemolytica* involucrados en pasteurelisis pulmonar ovina. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1985. México D.F. 1985. 72 SARH-UNAM. México, D.F. (1985)

42.-Lo, R. C; Strathdee. C. A; shewen, P. E; 1987 nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica*. *Al Infect. Immunol.* 55; 1987.

43.-Luna; L. G. ; Manual of Histologic Staining Methods of the armed Forces Institute of Pathology. 3rd. ed. Mac Graw-Hill Book Company U.S.A; p. 36. 1968.

44.-Martin, S. W; Meek, A. M; Davis, D. G; Thomson, R. G; Jhonson, J. A; López A; Sthepen , L; Curtis, R. A; and Prescott.: Factors associated With mortality in feedlot Cattle. The Bruce County beef Project, *Can. J. Comp. Med*; 44 : 1 (1980).

45.-Michel, B.B. Stanley, M. S. ; 1980 Selected methods in cellular immunology. Ist. Ed. W. H. Freedman and Co; San Francisco, USA. P. 219.

46.-Morales J. A. J. F.: E valuación experimental y en campo de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. Tesis de maestría. Fac. de Est. Sup. Cuaut. Universidad Nacional Autonoma de México. 1991.

- 47.-Morales, F. J., Ayala, D., Jaramillo, L., Trigo, J. F: Evaluación de Fagocitosis, Efecto Bactericida y Citotoxicidad de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* en Macrofagos Alveolares de Bovinos. Rev. Lat.-Amer. Microbiol., 36: 57-66, (1994).
- 48.-Pass, D. A. y Thompson, R.G. 1971, Wide distribution of *Pasteurella haemolytica* type lover the nasal mucosa of cattle Can. J. Comp. Met. 35 : 181.
- 49.-Prince, D. V. 1985 serotypes of *Pasteurella haemolytica* from the respiratory tract of sheep in New Zeland. N. Z. Vet. J. 33:76
- 50.--Petras, S. F., Chidambaram, M., Illyes, E., Froshauer, S., Weinstock, G. M., and Reese, C. P., Antigenic and Virulence Properties of *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin Mutants. *Infec Immuni.*, 63: 1033-1039 1995.
- 51.-Rowe R.S.E., Wilt, G.R., Wu, G.,: Characterization and comparasion of antimicrobial susceptibilities and outer memebrene protein and plasmid DNA profiles of *Pasteurella haemolytica* and certain other members of the genus *Pasteurella.*, Am. J. vet. Res. 52:2016-2022 (1991).
- 52.-Shewen, P.E., 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).
- 53.-Sutherland, A. D. and Donachie, W.: citotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. *Vet. Microbiol*; 11: 331 (1986).
- 54.-Trigo, F.J., Breeze, R.G., Everman, J.F. and Galina, A.M.: Pathogenesis of experimental bovine respiratory syncytial virus infection in shepp. Am. J. vet. Res., 45: 1663-1670 (1984)
- 55.-Williams W.: Bergeys manual of systematic bacteriology. 2: 5. 1986.