



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**" AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL
DE *Pasteurella* sp. DE CUADROS NEUMONICOS
EN BOVINOS Y OVINOS "**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :
CYNTHIA GONZALEZ RUIZ**

**A S E S O R E S :
M. EN C. J. FRANCISCO MORALES ALVAREZ
M. EN C. VICTOR RUBEN TENORIO GUTIERREZ
M. V. Z. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

A. A. M.
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 .

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

Con base en el art. 23 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que devuélvase la TESIS:
"Aislamiento y caracterización parcial de *Pasteurella* sp. de cuadros
neumónicos en bovinos y equinos."

que presenta la pasante: Concha González Ruiz.

con número de cuenta: 5602312 para obtener el TÍTULO de:
Médica Veterinaria Societista.

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

A T E N T A M E N T E .
"POR MI FAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 27 de noviembre de 1996

PRESIDENTE	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
VOCAL	M. en C. Alejandro Martínez Rodríguez	
SECRETARIO	M. en C. Francisco Morales Alvarez	23 NOV 96
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Víctor Quintero Ramírez	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra	

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES:

GRACIAS POR DARMEN LA VIDA, POR ENSEÑARME A SACRIFICAR Y VALORAR EN CADA MOMENTO LAS COSAS QUE DIOS NOS BRINDA BUENAS O MALAS. LA META QUE HOY LOGRO ES SUYA Y SI ALGUIEN SE MERECE ÉSTE ESFUERZO SON USTEDES.

LOS AMO.

A MIS HERMANOS:

GABY, GRACIAS POR QUE APARTE DE SER MI HERMANA ERES MI ETERNA AMIGA, Y JUNTAS HEMOS COMPARTIDO TRIUNFOS Y DERROTAS. GRACIAS POR TU APOYO INCONDICIONAL, PORQUE JUNTO CON ISAAC HAN SIDO MI EJEMPLO A SEGUIR Y ESPERO NO DEFRAUDAR EL SACRIFICIO QUE AMBAS HEMOS COMPARTIDO.

QUE DIOS TE BENDIGA SIEMPRE.

ISAAC, GRACIAS POR APOYARME Y CREER. LA PERSEVERANCIA ES ALGO DE LO MUCHO QUE HE APRENDIDO DE TI. ¡RENOVAR O MORIR!

TE QUIERO MUCHO.

A MI NOVIO.

ALFREDO, GRACIAS POR AYUDARME A QUE ESTE
SUEÑO POR FIN SE VUELVA REALIDAD. POR TENERME
TANTO AMOR, CONFIANZA Y PACIENCIA.
DESEO TANTO QUE JUNTOS SIGAMOS HACIENDO
NUESTROS SUEÑOS REALIDAD I S I E M P R E I ,
EN ÉSTA VIDA Y EN LA OTRA .
TE AMO.

A MIS ASESORES :

GRACIAS AL M. EN C. FRANCISCO MORALES POR
SU PACIENCIA, AMISTAD Y CONFIANZA PARA LA
REALIZACIÓN DE ÉSTE TRABAJO, ASÍ COMO AL
DR. VÍCTOR TENORIO Y AL MVZ ALFREDO CUELLAR.

GRACIAS Dr. ERASMO NEGRETE Y AL CINVESTAV,
POR FACILITARME LA AYUDA NECESARIA EN LA
REALIZACIÓN DE ÉSTE TRABAJO.

GRACIAS AL INIFAP Y A TODA LA GENTE DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA,
PRINCIPALMENTE A LORENA ARCHUNDIA.

GRACIAS A JUAN CARLOS DEL RIO POR SER GRAN
AMIGO, MAESTRO Y RECORDARME LO IMPORTANTE
QUE ES VIVIR.

SECCIÓN DE PATOLOGÍA:

**GRACIAS A TODOS LOS QUE INTEGRAN LA SECCIÓN ,
POR CONTRIBUIR A MI FORMACIÓN PROFESIONAL
Y DOCENTE : JUAN CARLOS DEL RÍO.VÍCTOR,
FRANCISCO, BLANCA, DAVID, JUAN B., LUIS ENRIQUE,
ALEJANDRO, ALFREDO, BIBIANA, PATY, ANDREA Y ALEJO .**

A MIS AMIGOS :

**QUIENES CON SU AMISTAD Y SU EJEMPLO
FORTALECIERON EL DESEO DE LLEGAR LA META:
MAYRA, ALFREDO, JUAN B, DAVID, LUIS ENRIQUE,
ALEJANDRO, SANDRA, IGNACIO R. NACHO SALAS,
JUAN C. DEL RÍO, JUAN L., ALEJO, BIBIANA, Mg. LUISA.**

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	12
HIPÓTESIS	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	37
LITERATURA CITADA.....	38

RESUMEN

En el presente trabajo se obtuvieron aislamientos de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* para evaluarlos comparativamente con aislamientos obtenidos de microbiota normal de bovinos y ovinos. A dichos aislamientos se les identificó por métodos bacteriológicos convencionales, tratando de correlacionarlos con los diferentes grados de lesión, tanto macroscópica como microscópicamente, donde las lesiones macroscópicas se evaluarón mediante la impresión en papel de las zonas afectadas, determinado el porcentaje de lesión. Para *Pasteurella haemolytica* se evaluó la capacidad de producción de leucotoxina, mediante ensayo visual simple. Los serotipos capsulares de *Pasteurella haemolytica* se identificaron mediante la técnica de hemoaglutinación indirecta, utilizando antisueros de referencia. La tipificación de *Pasteurella multocida* se realizó utilizando la prueba de inmunodifusión en gel. Se determinó la producción de proteasas de secreción, tanto de *Pasteurella haemolytica* como de *P. multocida*, mediante la técnica de electroforesis en gel. Se trabajaron 32 aislamientos de bacterias del género *Pasteurella*, de los cuales 21 correspondieron a *Pasteurella haemolytica*, todos ellos obtenidos de borregos. Los otros 11 aislamientos correspondieron a *Pasteurella multocida*. De los 21 aislamientos de *Pasteurella haemolytica*, 8 pertenecieron al serotipo A16, 9 al serotipo A2 y uno para los serotipos A11, A8, A1 y A10, respectivamente. Es importante señalar, que en pulmones neumónicos, fue más alta la frecuencia de aislamientos del serotipo A16, mientras que de microbiota normal fue el serotipo A2. De los 11 aislamientos de *Pasteurella multocida*, 4 pertenecieron al serotipo somático 3, tipo A, 4 al serotipo somático 6, tipo D, 2 al serotipo somático 3,

tipo D y I al serotipo somático 9, tipo D. Los aislamientos de pulmones neumónicos, mostraron un aparente mayor efecto citotóxico, comparado con los obtenidos de microbiota normal. Sin embargo, estadísticamente no hubo diferencia significativa. Se encontró mayor efecto citotóxico a la cuarta hora de incubación; para los aislamientos obtenidos de neumonías el título registrado fue de 96.83 ± 77.92 , observándose un decremento importante a la sexta hora de incubación con un título de 34.05 ± 33.29 . En los aislamientos de microbiota normal, se observó que los títulos permanecen constantes tanto a la cuarta hora (76.45 ± 67.91), como a la sexta hora (72.5 ± 59.15) de incubación. De los 32 aislamientos de *Pasteurella haemolytica* y *multocida*, se trabajó con 24 de ellos para determinar la presencia de proteasas de secreción. De los 20 aislamientos que correspondían a *P. haemolytica*, en 19 de ellos se observó actividad de proteasas en los sobrenadantes. Para *P. multocida* de los 4 aislamientos que se procesaron, todos mostraron actividad enzimática.

Es evidente la participación de otros serotipos como el A16 de *Pasteurella haemolytica* a los comúnmente descritos en la literatura. Asimismo, se pone de manifiesto la importancia del serotipo D de *Pasteurella multocida*, ocasionando cuadros de pleuroneumonía fibrinosa severa. En *Pasteurella haemolytica* y *multocida* se demostró la producción de moléculas con actividad de proteasa diferente a la sialoglicoproteasa descrita para *P. haemolytica*, debido al mayor peso molecular de las moléculas encontradas. Ésto es importante porque dichas moléculas pudieran jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La producción de carne y leche no ha podido incrementarse con la misma rapidez con la que ha aumentado la población mundial, debido a diferentes factores. Entre estos factores los procesos infecciosos son causa importante de morbilidad y mortalidad en rumiantes. En Europa y Norteamérica, incluyendo México, las infecciones respiratorias son un grupo destacado de problemas en éste rubro ¹².

Las neumonías constituyen uno de los principales problemas de salud en los rumiantes. Entre las pérdidas que ocasionan, se incluyen la muerte de los animales enfermos, los elevados costos de los tratamientos, el bajo rendimiento de los animales afectados, decomisos en el rastro y, además, el costo derivado de la aplicación de tratamientos. Todo esto ocasiona que los costos de producción aumenten y la disponibilidad de alimentos disminuya ¹³.

Estudios realizados en México, destacan la importancia de las neumonías en becerros, ya que clínicamente la incidencia y prevalencia alcanza hasta un 24 % en la etapa de lactancia ¹. Por otro lado, en estudios sobre mortalidad en corderos, se ha determinado que la muerte de éstos, asociada a procesos neumónicos, puede rebasar el 20 %. En estos trabajos se ha demostrado que el mayor porcentaje de mortalidad por neumonías se acentúa entre los 2 y 3 meses de edad ^{4,13,14}.

En otros estudios donde se evaluó la mortalidad perinatal en ovinos de la zona de Milpa Alta, D.F., se demostró que la cifra alcanzada por neumonías era del 32 % ⁵. Un resultado similar fue obtenido en la zona de influencia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México ¹⁵.

Como cualquier otro sistema que está en contacto con el medio ambiente, el sistema respiratorio tiene su propia microbiota. Esta población de microorganismos está restringida a la porción proximal del sistema de conducción (cavidad nasal, nasofaringe y laringe). Las porciones distales de los sistemas de conducción, transición y de intercambio son esencialmente estériles ³⁴.

Los tipos de bacterias presentes en la cavidad nasal varían considerablemente entre las diferentes especies animales, así como también, de acuerdo al medio ambiente en el que se crían estos animales. *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* son parte de la microbiota normal de rumiantes y también son agentes causales de la pasteurelisis neumónica. Estudios experimentales han demostrado que las bacterias de la microbiota son constantemente acarreadas al pulmón a través del aire inspirado. A pesar de esto, el pulmón permanece estéril gracias a sus eficientes mecanismos de defensa; los cuales se dividen en inespecíficos y específicos ³⁴.

Dentro de los mecanismos inespecíficos, tenemos la generación de turbulencias de aire en la cavidad nasal, el atrapamiento de partículas por el aparato mucociliar, la expulsión de partículas atrapadas mediante el movimiento mucociliar; la disolución de gases tóxicos (solubles) en el moco; la destrucción y eliminación de material extraño y microorganismos, mediante la fagocitosis por macrófagos alveolares; la tos y el estornudo ³⁴. Las partículas con diámetros comprendidos entre 0.5 y 2 μ , tamaño al cual corresponden la mayoría de las bacterias, pueden franquear los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del aparato respiratorio superior y logran llegar hasta la pared del alveolo ³⁷.

A éste nivel existen otros mecanismos de defensa que son capaces de neutralizar a las bacterias; el principal responsable de esta inactivación es el macrófago alveolar ³⁷

Existen otras sustancias y mecanismos que ayudan a la protección del tejido pulmonar, entre ellas se encuentran anticuerpos, lisozima, transferrina, interferón y fracciones del complemento ^{30, 25, 26}.

Se menciona que los factores predisponentes juegan un papel determinante en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo: las condiciones medio ambientales adversas como temperatura baja, humedad alta y ventilación deficiente, aunados a la mala alimentación pueden favorecer la presentación del complejo respiratorio. ^{1, 2, 3, 25, 42, 43}

El estado de estrés implica la insaturación de una reacción neuroendócrina que conlleva la liberación de esteroides de la corteza adrenal. Cuando el estímulo que provoca ésta reacción se prolonga, la liberación de esteroides endógenos, principalmente cortisol, disminuirá la capacidad del animal para establecer una respuesta inmune adecuada. Si a éstas condiciones estresantes se les añade una higiene deficiente y una elevada humedad relativa (mayor a 80 %), existe una mayor posibilidad de que se presenten enfermedades respiratorias, debido al alto grado de contaminación y a la mayor supervivencia de los microorganismos en el medio ^{12, 24, 31}.

Otra situación de gran relevancia es la nutrición de los animales. Recientemente se ha demostrado que las deficiencias de vitaminas y minerales traza influyen desfavorablemente en la capacidad de respuesta inmune; si bien no se ha determinado con exactitud la manera en que esto ocurre ^{12, 24, 31}.

También se ha demostrado la participación de agentes primarios de tipo viral como adenovirus, virus respiratorio sincitial bovino, parainfluenza - 3, rinotraqueitis infecciosa bovina (herpesvirus 1), entre otros, que además de causar un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar con lo cual se facilita la colonización pulmonar por agentes bacterianos ^{29,30}

La naturaleza básica de la lesión pulmonar causada por *Pasteurella multocida* puede iniciarse con una bronconeumonía, donde la lesión comienza en los bronquiolos terminales y de ahí se difunde a los alveolos adyacentes. Los bronquiolos presentan una reacción inflamatoria aguda, con congestión de sus paredes e infiltración de su luz por neutrófilos. A continuación las bacterias se extienden a los alveolos vecinos, los cuales se observan con congestión y edema. Por esto, la lesión tiene al inicio una distribución en "parches" multifocales, localizada sobre todo en la porción craneoventral. Si la lesión avanza, los lobulillos afectados coalescen para producir una zona de consolidación lobular ²².

Este tipo de neumonía suele ser causada por infección bacteriana del pulmón y se difunde a lo largo de los conductos respiratorios. El sitio de la lesión inicial, es la unión bronquioalveolar, que suele ser susceptible debido a la ausencia de capa de moco, la concentración de partículas inhaladas en los bronquiolos durante el flujo de aire y la disminución de la velocidad del flujo en esta región. La presentación de este tipo de neumonía en la zona craneoventral pulmonar, pudiera deberse a que los lóbulos anteriores presentan una menor velocidad de eliminación de partículas por el aparato mucociliar ²².

La neumonía causada por *Pasteurella 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, distribución y morfopatología. En estos cuadros podemos encontrar desde neumonías supurativas focales y difusas, hasta cuadros donde existen lesiones vasculares con trombosis y hemorragias, en los que adicionalmente se puede observar la transformación de macrófagos dando un aspecto arremolinado o de "avena" y es posible que éstos cuadros diversos sean ocasionados por diferencias en cuanto a propiedades patogénicas de la bacteria ¹⁶.

En el año de 1932, Newson y Cross, trabajando en el estado de Colorado, E.U.A., estudiaron los problemas neumónicos de los ovinos y aislaron en forma consistente microorganismos a los que podían clasificar de acuerdo a pruebas bioquímicas y serológicas en dos diferentes grupos: el de bacterias típicas, las indol positivas y no hemolíticas para las que propone se conserve el nombre originalmente dado por Kitt de *Pasteurella multocida* dada la característica de que afecta a varias especies animales y para el grupo atípico, el nombre de *Pasteurella haemolytica*. Esta nomenclatura se mantiene vigente en la actualidad ²⁷.

Por mucho tiempo, se desconoció la importancia de *P. haemolytica* y *P. multocida* en el proceso de la enfermedad respiratoria, ya que no eran capaces por sí solas en condiciones experimentales de causar la enfermedad. Solo cuando se estableció la idea del complejo neumónico de etiología múltiple o multifactorial, se comenzó a considerar que éstas bacterias podían ser invasoras secundarias y responsables de producir lesiones graves en el pulmón ³⁰.

Pasteurella haemolytica es un agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes ³. El primer aislamiento de *Pasteurella* fue

realizado por Kitt en 1885 y le denominó "*Bacterium bipolare multocidum*". Jonesen, en 1921, agrupa a las diferentes especies: *P. bovisseptica* o subgrupo I (indol negativa). *Pasteurella* subgrupo II y subgrupo III, a las indol positivas y no hemolíticas, proponiendo el nombre de *Pasteurella vitulisepticus* para éstas últimas ?.

Entre las características generales de *P. multocida* y *P. haemolytica*, es que son bacterias de forma cocobacilar, que miden de 1,4 por 0,4 micras, se agrupan en empalizadas o cadenas cortas, son Gram (-) presentan una coloración bipolar, la cual es más manifiesta con la tinción de Wright, son anaerobios facultativos, inmóviles, no forman esporas poseen cápsula y son oxidasa (+) +?.

La mayoría de las cepas fermentan los carbohidratos, pero producen una pequeña cantidad de ácido, no fermentan la lactosa o lo hacen débilmente, no producen gas, no licúan la gelatina y no coagulan la leche +?.

En agar sangre, el crecimiento es aparente entre las 24 y 48 horas de incubación, las colonias son de tamaño variable, por lo general entre 2 y 3 milímetros de diámetro, grisáceas, no hemolíticas, excepto *P. haemolytica* y algunas cepas producen colonias mucoides. *P. multocida* produce H₂S e Indol, mientras que *P. haemolytica* no produce Indol +?.

P. multocida posee antígenos capsulares, que son básicamente polisacáridos y lipolisacáridos, los cuales han demostrado ser estructuras antigénicas diferentes, y se emplean para su clasificación. Así, Roberts propone con base en los antígenos capsulares que presentan, una clasificación numérica denominándolos I, II, III, IV, y V. Carter, utilizando la prueba de hemaglutinación indirecta los reclasificó, utilizando una nomenclatura

alfabética y los denominó como A, B, D y E. Posteriormente se realizó una equivalencia entre las dos clasificaciones, quedando de la forma siguiente: el tipo A de Carter es equivalente a los tipos II, III y IV de Roberts, el tipo B al tipo I y el tipo D al tipo V, no encontrando su equivalencia para el tipo E. Asimismo, Carter y Subronto determinaron la efectividad de una solución acuosa de acriflavina agregada al medio de cultivo, permitiendo identificar al tipo D, por la formación de un precipitado floculante dentro de los siguientes 30 minutos, mientras que los tipos A, B y E, no presentan ésta reacción. Para la identificación del tipo A, se ha utilizado el método de la decapsulación por hialuronidasa. Por otro lado, Hendlesten y col., utilizando la técnica de precipitación en agar identificaron 16 serotipos somáticos diferentes⁴¹.

Así, dentro de los cuatro tipos de *P. multocida*, el A es el que se ha relacionado más frecuentemente con problemas neumónicos del ganado y con el cólera aviar y en algunos casos con neumonías de cerdos, teniendo una amplia distribución geográfica incluyendo a México. El tipo D se aísla principalmente de porcinos, está relacionado con la rinitis atrófica y neumonías en cerdos habiéndose identificado en México como causante de neumonías en bovinos. El tipo B, causante de la septicemia hemorrágica en bovinos, caprinos, ciervos y búfalos ha sido aislada en animales de África y Asia, así como del sur de Europa y Australia. El tipo E, quien también causa la septicemia hemorrágica, se aísla de animales en África central⁴².

De *Pasteurella haemolytica* se han reconocido, por hemoaglutinación indirecta, o mediante aglutinación rápida en placa: 17 serotipos de acuerdo a antígenos capsulares solubles; ^{20,43} estos antígenos son básicamente polisacáridos con alta capacidad antigénica; a su vez estos serotipos están contenidos en los biotipos A y T por las características bioquímicas de la bacteria¹⁰. Los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 corresponden al biotipo

A que produce la pasteurelosis neumónica en corderos y neumonía en borregos adultos. Los serotipos 3, 4, 10 y 15 pertenecen al biotipo T, causante de una enfermedad septicémica en corderos entre 6 y 10 meses ⁴⁹. La nomenclatura actual está encaminada a reconocer al biotipo T como una especie más del género *Pasteurella* denominada *Pasteurella trehalosi* ³⁶.

En ovinos el serotipo más importante a nivel mucosa respiratoria es el A2, sin embargo, se han reconocido los 17 serotipos como patógenos y representan el 90 % de los aislamientos. El otro 10% permanece como no tipificable y se duda su patogenicidad.¹² sin embargo, estudios preliminares en México han demostrado la importancia de otros serotipos como el A5 y el A9⁴.

Pasteurella haemolytica produce en fase logarítmica de crecimiento una sustancia soluble que es tóxica para macrófagos y leucocitos en general. La citotoxina, también llamada leucotoxina, es soluble en agua, consta de una fracción protéica, que es sensible a tripsina, debido al componente protéico esencial, su actividad citotóxica óptima es a 37 °C y se inhibe a 4 °C, es estable a pH de 2 a 12 y resiste el calor hasta 60 °C ⁴⁶.

La leucotoxina es producida por los diferentes serotipos capsulares de *P. haemolytica*, presenta las mismas características en todos ellos, por lo cual 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 ¹⁴.

Esta leucotoxina es una citolisina productora de poros, compuesta por dos o más subunidades protéicas con pesos moleculares de 105 mil D, que dañan 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 transmembral, permitiendo la salida de potasio intracelular e incorporación de calcio y sodio extracelular, con ello, la presión osmótica intracelular se hace más alta y la célula se hincha, con la consecuente lisis y salida de componentes citoplasmáticos ¹⁹.

La leucotoxina induce citólisis de neutrófilos y plaquetas, lo cual produce daño al alveolo debido a la liberación de enzimas lisosómicas y radicales oxígeno libres. A parte de la actividad citotóxica, estudios recientes han mostrado que la leucotoxina modifica la función del neutrófilo²¹.

Estas modificaciones incluyen aumento de la producción de mediadores de la inflamación como el leucotrieno B4 y el ácido 5-hidroxi-eicosatetraico. Estos cambios pueden amplificar la respuesta inflamatoria resultando en lesiones más severas o mejorando la bacteriolisis. Además las concentraciones subclínicas de leucotoxina inhiben la blastogénesis de linfocitos bovinos lo cual podría reducir las defensas inmunomediadas contra *Pasteurella haemolytica* ²².

Las actividades funcionales de la endotoxina de *P. haemolytica* han empezado a ser mejor entendidas en relación a su papel en la pasteurelosis neumónica. Se ha mostrado 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 al endotelio mediante la estimulación del factor tumoral de necrosis (TNF) y por la producción de interleucina-1 por macrófagos alveolares ²³.

Con respecto a los factores de virulencia extracelulares de *P. haemolytica* además de la leucotoxina, cuenta con una proteasa neutra, la hemolisina y la neuraminidasa. La proteasa neutra de *P. haemolytica* hidroliza específicamente sialoglicoproteínas⁴³; sus efectos han sido demostrados en glicoproteínas de la membrana de eritrocitos humanos, no posee acción sobre eritrocitos, células endoteliales y macrófagos de bovino, por lo cual, su participación en la patogénesis del daño pulmonar es incierta⁴³. Se ha informado recientemente que en mutantes de *P. haemolytica* que no producen leucotoxina aún se mantiene su actividad de sialoglicoproteasa⁴². Sin embargo, estudios realizados en *Actinotracillus pleuropneumoniae* demuestran que otras proteasas de secreción son factores de virulencia que se involucran directamente con la patogénesis de la bacteria⁴⁴.

Una vez que *Pasteurella haemolytica* gana el acceso al alveolo pulmonar, factores bacterianos estimulan una respuesta inflamatoria intensa y aguda. Estos factores bacterianos asociados con los del hospedador inducen daño tisular localizado y estimulan una respuesta sistémica asociada con el proceso inflamatorio agudo³⁶. Durante la fase temprana de crecimiento logarítmico de la bacteria, se ha observado por microscopía electrónica la presencia de fimbrias y glicocálix bacteriano. Las fimbrias son de aproximadamente 5 nm de ancho y de 300 nm de longitud, están presentes solo cuando la bacteria se cultiva de manera estacionaria. Por otro lado el tamaño del glicocálix es de 150 nm de grosor y su tamaño disminuye cuando los cultivos tienen más de 18 hrs de incubación^{16,45}.

La función que tiene este tipo de estructuras con los mecanismos de patogenicidad están relacionados con la colonización a nivel del aparato respiratorio alto, actuando como un factor de unión de la bacterias a las

células epiteliales de la mucosa nasofaríngea, mientras que el glicocálix puede conferir a la bacteria las propiedades antifagocíticas ^{18,46}.

Es reconocido que la vacunación es el mejor método para el control de la pasterrelosis y las investigaciones se han concentrado en la identificación y caracterización de inmunógenos potencialmente protectivos en cepas de origen ovino y bovino ³⁶. En la actualidad se han desarrollado una diversidad de inmunógenos para prevenir la neumonía causada por *P. haemolytica* con resultados aparentemente satisfactorios en algunos casos ³⁶. Estos inmunógenos varían en cuanto a la vía de inoculación, adyuvantes utilizados, tipos de antígenos: vivos ¹², muertos ¹³ y extractos ^{19,22}.

OBJETIVOS

- Aislamiento, identificación y tipificación de bacterias del género *Pasteurella* de diferentes lesiones neumónicas en bovinos y ovinos.

- Evaluar la capacidad de producción de leucotoxina como propiedad patogénica de *Pasteurella haemolytica* aislada de cuadros neumónicos de diferente intensidad en bovinos y ovinos.

- Determinar la presencia de proteasas de secreción del género *Pasteurella*.

HIPÓTESIS

Los tipos y serotipos de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida*, así como las propiedades patogénicas, pueden variar dependiendo de la especie animal afectada o de la intensidad o severidad del proceso neumónico.

MATERIAL Y MÉTODOS .

MATERIAL BIOLÓGICO.

Los aislamientos de *Pasteurella* fueron realizados en el laboratorio de Microbiología de la FES - Cuautliltán , y en el laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología, INIFAP- SAGAR. El aislamiento se realizó a partir de muestras de pulmón remitidas al laboratorio de Patología de la FES-Cuautliltán. Además se contaban con 11 aislamientos de *P. haemolytica* y uno de *P. multocida*, obtenidos en un trabajo previo ⁴ a partir de microbiota normal de ovino. También se contaba con una cepa de referencia de *P. haemolytica* serotipo A1.

EXAMEN MACROSCÓPICO.

Los pulmones se conservaron en refrigeración hasta obtener el porcentaje del área afectada mediante la impresión en papel de ésta zona. Ésto se realizó con la toma de diapositivas, cuando ésta fue posible, de la porción dorsal y ventral del pulmón, las cuales fueron proyectadas en esquemas en papel del pulmón para determinar el porcentaje afectado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ PULMÓN AFECTADO} = \frac{100 \times \text{PESO DEL ÁREA AFECTADA}}{\text{PESO TOTAL DEL PAPEL}}$$

EXAMEN BACTERIOLÓGICO.

Se intentó el aislamiento de la porción del pulmón más dañada. Las muestras fueron sembradas en agar sangre e incubadas a 37 °C durante 24 horas; la identificación de los agentes se realizó por métodos bacteriológicos convencionales¹³.

EXAMEN MICROSCÓPICO.

El examen histopatológico se llevó a cabo mediante la conservación de secciones representativas de lesión pulmonar, las cuales se fijaron en formol al 10 %, se incluyeron en parafina y fueron teñidas con la técnica hematoxilina-eosina para su evaluación microscópica¹⁴.

CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA DE *P. haemolytica*: Se cultivaron las cepas 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 amortiguadora (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 del medio RMP1 1640, 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 incubaron las muestras en baño María a 37 °C con movimiento constante a una velocidad de 150 RPM, durante seis horas. A la hora 4 y 6 de incubación se obtuvieron alícuotas de un mililitro de cada vial depositándolo en microtubos cónicos de plástico, y se congelaron hasta su evaluación. La

cantidad de leucotoxina producida se determinó empleando un ensayo visual simple ²¹.

ENSAYO VISUAL SIMPLE PARA LA DETERMINACIÓN 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 obtenida mediante choque hipotónico de sangre completa. Se realizaron diluciones dobles de los sobrenadantes de cultivos obtenidos a la hora 4 y 6 de incubación en microplacas de titulación de 96 pozos de fondo plano. Se adicionó medio RPMI 1640 a cada pozo, posteriormente se agregaron los sobrenadantes de cultivo en la fila A.; a partir de ésta fila se procedió a hacer diluciones dobles hasta la fila H, enseguida se añadió la suspensión de leucocitos 1×10^7 cel / ml y se incubó durante una hora a 37 °C. Al finalizar este período, las placas se centrifugaron a 800 g por cinco minutos, a cada pozo se le adicionó SSA formalinizada al 10 %, y se incubó 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 la ausencia de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* en los sobrenadantes.

Un fondo claro indicaba la presencia de citotoxina libre ejerciendo su efecto de lisis sobre las células "blanco", eliminando el sustrato celular a teñir ¹⁷.

CHOQUE HIPOTÓNICO PARA LA OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

Se tomaron muestras de sangre periférica de bovino 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 produce la lisis de los eritrocitos. Posteriormente, se le agregó la misma cantidad de SSA concentrado 2X, con lo cual se detenía la lisis eritrocítica.

Esto se centrifugó a 800 G por cinco minutos, este procedimiento se realizó hasta obtener el paquete globular blanco, libre de eritrocitos, se estandarizó la concentración a 5×10^6 células por mililitro resuspendidas en RMPI-1640 ²².

DETERMINACIÓN DE LOS SEROTIPOS CAPSULARES DE *P. haemolytica*.

Los serotipos capsulares de *P. haemolytica* fueron determinados por Hemoaglutinación Indirecta, utilizando antisueros de referencia y siguiendo la técnica sugerida por Frank (1978) en microplacas de titulación de 96 pozos.

Para preparar el antígeno (eritrocitos sensibilizados), se hizo crecer a la bacteria en medio líquido PPLO durante 18 horas a 37 °C en una incubadora con agitación a 150 RPM. Posteriormente se inactivaron los cultivos en baño maría a 56°C por 30 min. Se agregaron 100 µl de eritrocitos de bovino previamente lavados con PBS a una concentración del 1%. Inmediatamente, se incubó en el baño durante 1 hora a 37 °C, los eritrocitos se lavaron 3 veces por centrifugación y fueron resuspendidos, finalmente, a una concentración del 1%.

En placas de microtitulación de 96 pozos de forma en "U" se agregaron 25 μ l de PBS; en el primer pozo de cada fila se puso el antisuero a probar (de referencia del 1 al 16). Se hicieron diluciones dobles de los antígenos determinados hasta la fila H. Posteriormente se agregaron 25 μ l de eritrocitos sensibilizados con *Pasteurella haemolytica* del serotipo a probar y se dejaron incubar de 1 a 2 horas a 37 °C. Al finalizar este periodo, se realizó una primera lectura y se incubaron las placas durante toda la noche a temperatura ambiente para realizar posteriormente la segunda lectura de las placas \mathcal{M} .

TIPIFICACIÓN DE *Pasteurella multocida*.

La determinación de los serotipos somáticos se realizó mediante la prueba de inmunodifusión en gel. Se cultivaron las cepas a probar en agar sangre por 18 horas, posteriormente se cosechó en tubos eppendorff en un mililitro de solución salina fisiológica. Se sometió a calor húmedo 15lb, 15 min, 120 °C y se centrifugó a 3.000 g, 10 min., a 4 °C \mathcal{M} .

Se obtuvo el sobrenadante y se congeló hasta su evaluación. De ésta manera se obtuvieron extractos de la bacteria para ser utilizados como antígenos y posteriormente fueron probados con antisueros de referencia. La prueba se realizó en portaobjetos que contenían en su superficie agar noble salino al 8.5% con perforaciones en forma de roseta. Los orificios hechos en el agar se llenaron con 20 μ l con el antisuero de referencia en el centro y en las perforaciones de la periferia se colocaron los extractos del aislamiento a probar.

Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. La lectura para localizar las líneas o bandas de identidad se hizo en una cámara de fondo oscuro ²⁶.

Para determinar los serotipos capsulares se utilizaron las pruebas de floculación de la acriflavina y decapsulación con hialuronidasa utilizando una cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* (cepa Cowan) ¹³.

DETERMINACIÓN DE PROTEASAS DE SECRECIÓN.

Los aislamientos de *P. haemolytica* y *P. multocida* se sembraron en medio líquido PPLO, se incubaron con agitación constante durante 18 horas a 37°C. Posterior a este tiempo, se centrifugó a 3000 X g por 20 min. y se separó el sobrenadante. A éste sobrenadante se le agregó sulfato de amonio al 70 % para precipitar las proteínas. Se volvió a centrifugar a 3.000 X g por 20 min. se desechó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 100 µl de PBS (1x) Se realizó una diálisis de las suspensiones por 18 horas a 4°C contra PBS (2x).

Entre 30 ó 40 µl de cada muestra fueron adicionados en amortiguador de muestra, posteriormente se cargaron en una cámara de electroforesis y se corrieron en gels de poliacrilamida al 10%, copolimerizada con 0.1 % de gelatina. El corrimiento se realizó a 85 volts a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.

Posteriormente el gel se lavó durante una hora mínimo con triton X 100 para desechar el exceso de SBS. Se dejó toda la noche activándose con calcio y se tiñó con azul de Coomassie y posteriormente se destiñó con ácido acético (10 : 40), metanol y H₂O y se realizó la lectura.

RESULTADOS.

Se trabajaron 32 aislamientos de bacterias del género *Pasteurella*, de los cuales 21 correspondían a *Pasteurella haemolytica* todos ellos obtenidos de borregos. Los otros 11 aislamientos corresponden a *Pasteurella multocida*. De los 21 aislamientos de *P. haemolytica*, 11 fueron obtenidos de microbiota normal de ovinos clínicamente sanos en un trabajo previo¹. El resto fueron aislados de procesos neumónicos de animales que presentaron muerte aguda o subaguda. Además se contaba con una cepa de referencia de *P. haemolytica* serotipo A1.

De *P. multocida* 10 eran aislamientos de pulmones neumónicos de bovinos jóvenes que presentaron muerte aguda y uno se aisló a partir de cavidad nasal de ovino clínicamente sano.

De los 21 aislamientos de *Pasteurella haemolytica* 8 pertenecían al serotipo A16, 9 al serotipo A2 y uno para los serotipos A11, A8, A1 y A10, respectivamente. En el cuadro 1 se muestra la distribución de los serotipos aislados según su origen. Es importante señalar que en pulmones neumónicos fue más alta la frecuencia de aislamientos del serotipo A16 mientras que de microbiota normal fue el serotipo A2.

De los 11 aislamientos de *Pasteurella multocida*, 4 pertenecieron al serotipo somático 3 tipo A, 4 al serotipo somático 6 tipo D, 2 al serotipo somático 3 tipo D y 1 al serotipo somático 9 tipo D (9.0%). En el cuadro 2 se muestra la distribución de los serotipos somáticos y los biotipos aislados según su origen.

EXAMEN MACROSCÓPICO. Los pulmones de los animales donde se aisló *Pasteurella haemolytica* macroscópicamente presentaban en su mayoría lesiones neumónicas de moderadas a severas (15.09% - 94.37%) de tipo lobar con pleuritis fibrinosa. Ocasionalmente se observaron cuadros de bronconeumonía o neumonía de tipo lobular (clasificación de acuerdo a Breeze R.G.: Respiratory Pathology Notes, Washington State University.)

Los aislamientos de *Pasteurella multocida* fueron obtenidos de bovinos que presentaban cuadros clínicos con disnea marcada, fiebre, anorexia, postración, salida de líquido sanguinolento por orificios nasales y muerte entre las primeras 12 y 24 hrs de presentación de los signos. A la necropsia se encontraron cuadros severos de pleuroneumonía fibrinosa difusa severa, ascitis severa y hemorragias generalizadas en diferentes órganos principalmente vísceras abdominales, todos éstos del mismo brote.

La intensidad de las lesiones obtenidas mediante la impresión en papel se muestran en los cuadros 3 y 4 relacionándolos con los serotipos aislados.

EXAMEN HISTOPATOLÓGICO. En términos generales, las lesiones histopatológicas de los pulmones con lesiones neumónicas fueron de intensidad severa en el caso de los bovinos, y de moderada a severa para los ovinos, esto en base al hallazgo macroscópico de la distribución de las lesiones. Se observó con mayor frecuencia cambios vasculares caracterizados por congestión, hemorragia y edema; distensión de septos interlobulillares debido a la infiltración de células inflamatorias entremezcladas con fibrina, pleuritis, infiltración intersticial de células mononucleares o polimorfonucleares. Además, era frecuente observar células fusiformes con aspecto arremolinado. Otras lesiones observadas con

menor frecuencia fueron: sincitios, hemorragias subpleurales y aumento relativo del tejido linfoide asociado a bronquios.

CINÉTICA DE PRODUCCION DE LEUCOTOXINA. La cinética de producción de leucotoxina para los diferentes aislamientos de *Pasteurella haemolytica* se muestran en la gráfica, los valores promedio de los títulos más altos, representados como el inverso de la dilución más alta registrada como positiva. Se observó que veinte de los aislamientos que tuvieron una mayor capacidad de producción de leucotoxina fueron los obtenidos de animales muertos por neumonía y la menor producción se observó en doce aislamientos de microbiota normal. Se encontró mayor efecto citotóxico a la cuarta hora de incubación; para los aislamientos obtenidos de neumonías el título registrado fue de 96.83 ± 77.92 , observándose un decremento importante a la sexta hora de incubación con un título de 34.05 ± 33.29 . En los aislamientos de microbiota normal, se observó que los títulos permanecen constantes tanto a la cuarta hora (76.45 ± 67.91), como a la sexta hora (72.5 ± 59.15) de incubación.

En los cuadros 5 y 6 se muestran los valores promedio de los títulos más altos.

PROTEASAS: De los 32 aislamientos de *Pasteurella haemolytica* y *multocida* se trabajó con 24 de ellos porque los geles, solo tenían capacidad para 6 cepas, esto se hizo para determinar la presencia de proteasas de secreción. De los 20 aislamientos que correspondían a *P. haemolytica*, en 19 de ellos se observó actividad de proteasas en los sobrenadantes. Para *P. multocida* de los 4 aislamientos que se procesaron, todos mostraron actividad enzimática.

En la Figura 1, se observan cuatro cepas de *Pasteurella haemolytica* de microbiota normal, que presentaron actividad enzimática alrededor de los 100 kD de peso molecular. Las tres cepas restantes son de origen neumónico y presentaron una actividad menor que las de origen de microbiota normal, observándose un peso molecular de entre 70 y 50 kD.

En la Figura 2, se observa en cuatro cepas de *Pasteurella haemolytica* de origen neumónico la degradación de la gelatina cercana a los 116 kD. Como puede observarse al comparar con las cepas de la Figura 1, los pesos moleculares son diferentes y esto es indicativo de la posible presencia de proteasas diferentes. Las últimas tres cepas de éste gel correspondían a *Pasteurella multocida* de origen neumónico, las cuales degradaron el sustrato a nivel de los 116, 97 y 30 kD, respectivamente.

La figura 3, muestra cepas todas de origen neumónico de *Pasteurella haemolytica* y *P. multocida*, donde se observa actividad en un espectro superior a los 205 kD en todos los casos.

Es importante señalar que en éste trabajo no se determinó cuáles pudieran ser los sustratos específicos de estas enzimas.

CUADRO 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS SEROTIPOS AISLADOS DE *P. haemolytica*. SEGÚN SU ORIGEN.

No. DE AISLAMIENTO	ORIGEN	SEROTIPO CAPSULAR
1	NEUMÓNICOS	A16
2	NEUMÓNICOS	A16
3	NEUMÓNICOS	A16
4	NEUMÓNICOS	A16
5	NEUMÓNICOS	A16
6	NEUMÓNICOS	A16
7	NEUMÓNICOS	A16
8	NEUMÓNICOS	A16
9	NEUMÓNICOS	A16
10	NEUMÓNICOS	A16
11	MICROBIOTA NORMAL	A10
12	MICROBIOTA NORMAL	A2
13	MICROBIOTA NORMAL	A2
14	MICROBIOTA NORMAL	A2
15	MICROBIOTA NORMAL	A2
16	MICROBIOTA NORMAL	A2
17	MICROBIOTA NORMAL	A2
18	MICROBIOTA NORMAL	A2
19	MICROBIOTA NORMAL	A2
20	MICROBIOTA NORMAL	A1
21	MICROBIOTA NORMAL	A2

CUADRO 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS SEROTIPOS AISLADOS DE *P. multocida*, SEGÚN SU ORIGEN.

Nº DE AISLAMIENTO	ORIGEN	SEROTIPO SOMÁTICO	TIPO	HIALURONIDASA	ACRIFLAVINA
1	NEUMÓNICOS	6	D	(-)	(+)
2	NEUMÓNICOS	3	D	(-)	(+)
3	NEUMÓNICOS	6	D	(-)	(+)
4	NEUMÓNICOS	9	D	(-)	(+)
5	NEUMÓNICOS	6	D	(-)	(+)
6	NEUMÓNICOS	6	D	(-)	(+)
7	NEUMÓNICOS	3	A	(+)	(-)
8	NEUMÓNICOS	3	D	(-)	(+)
9	NEUMÓNICOS	3	A	(+)	(-)
10	NEUMÓNICOS	3	A	(+)	(-)
11	MICROBIOTA NORMAL	3	A	(+)	(-)

CUADRO 3. PORCENTAJE DE INTENSIDAD DE LESIONES NEUMÓNICAS, RELACIONADAS CON LOS SEROTIPOS CAPSULARES AISLADOS DE *P. haemolytica*.

No. DE AISLAMIENTO	SEROTIPO CAPSULAR	% DE LESIÓN PULMONAR
1	A16	70.92
2	A16	50.33
3	A11	15.09
4	A16	31.94
5	A8	28.87
6	A16	43.09
7	A16	51.93
8	A16	20.74
9	A16	27.74
10	A16	49.92

CUADRO 4. PORCENTAJE DE INTENSIDAD DE LESIONES NEUMÓNICAS, RELACIONADAS CON LOS SEROTIPOS SOMÁTICOS Y BIOTIPOS AISLADOS DE *P. multocida*.

No. DE AISLAMIENTO	SEROTIPO SOMÁTICO Y BIOTIPO	% DE LESIÓN PULMONAR
1	6 - D	50.21
2	3 - D	39.21
3	6 - D	94.37
4	9 - D	64.92
5	6 - D	33.17
6	6 - D	47.42
7	3 - A	33.17
8	3 - D	50.21
9	3 - A	53.25
10	3 - A	39.45

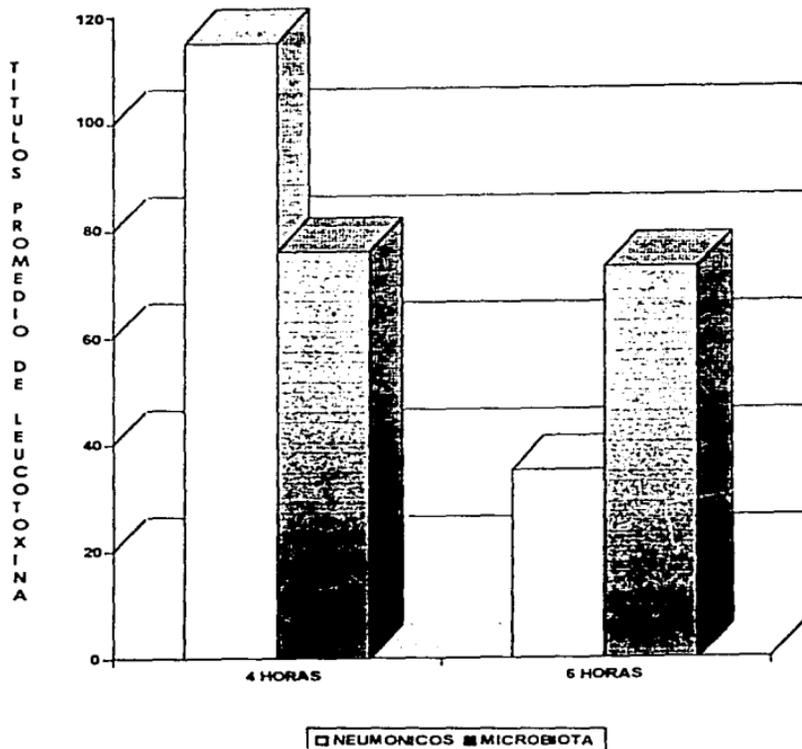
CUADRO 5. VALORES PROMEDIO DE TÍTULOS MÁS ALTOS DE LEUCOTOXINA.

	1a*	130,6		32b	24,6
	1a**	130		B24	144
	180-43a	36,5		B32	14,5
	180-14a	256		B52	173,3
	180-13b	129		B18	10
	4	133,3		B66	98,6
	180-27	54		21c	132
	P25	92		20a	14,6
	PHI-Ref	13,33			
	52b	180,26			
	SUMATORIA	1154,99		SUMATORIA	611,6
	PROMEDIO	115,50		PROMEDIO	76,45
	D.S	71,40		D.S	67,91
	V	5098,41		V	4612,37

CUADRO 6. VALORES PROMEDIO DE TÍTULOS MÁS ALTOS DE LEUCOTOXINA.

	CEFA	NEUMOCO MONAS	NE	CEFA	MICROBIOTA MONAS
1	1a*	24	4	32b	96
2	1a**	(-)	2	B24	93.3
3	180-43a	50.6	3	B32	9
4	180-14a	34.6	4	B52	24
5	180-13b	128	5	B18	192
6	4	14.5	6	B66	26.6
7	180-27	32	7	21c	50.6
8	P25	12	8	20a	88.5
9	PHI-Ref	41			
10	52b	12			
	SUMATORIA	348.7		SUMATORIA	580
	PROMEDIO	34.87		PROMEDIO	72.50
	D.S	36.15		D.S	59.15
	V	1306.84		V	3498.87

TÍTULOS PROMEDIO DE LEUCOTOXINA OBTENIDOS EN LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *P. haemolytica* DE ORIGEN NEUMÓNICO Y MICROBIOTA.



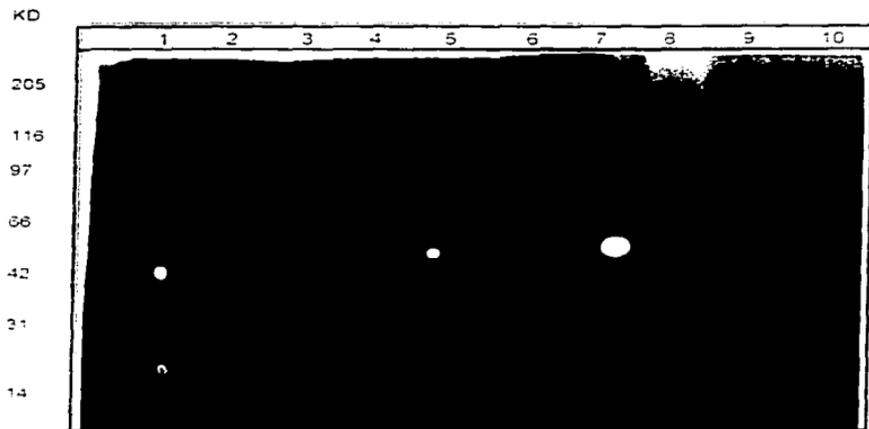


FIGURA 1. BANDAS OBSERVADAS CON ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN AISLAMIENTOS DE *Pasteurella hemolytica* DE MICROBIOTA NORMAL Y DE ORIGEN NEUMÓNICO OBTENIDAS DE OVINOS.

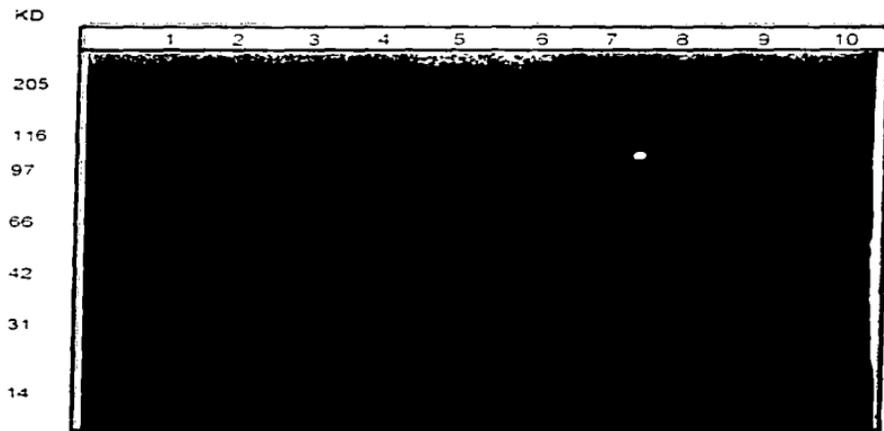


FIGURA 2. BANDAS OBSERVADAS CON ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN AISLAMIENTOS DE *P. hemolytica* Y *P. multocida* DE ORIGEN NEUMÓNICO.

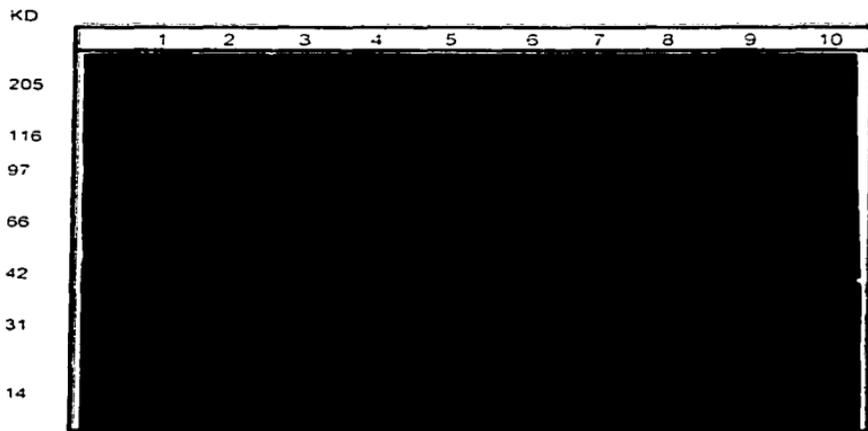


FIGURA 3. BANDAS OBSERVADAS CON ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN AISLAMIENOS DE *P. hemolytica* Y *P. multocida* DE ORIGEN NEUMÓNICO.

DISCUSIÓN

En México, diversos estudios han mostrado que los serotipos más comunes en bovinos corresponden al A1 y A2^{37,43,16} y en ovinos el A6, A7, y el A8^{37,43,16}; y a nivel mundial se menciona el serotipo A2 como más frecuente. Sin embargo, en el presente trabajo se demostró que el serotipo más común fue el A16. En los trabajos referidos, únicamente se utilizaron antisuecos de referencia que involucraban el serotipo del A1 al A12 y un porcentaje alto de las cepas aisladas fueron no tipificables, éstas pudieron corresponder al A16. En el presente trabajo, se trabajó con una batería de antisuecos que incluían el A13, A14, T15, y A16, lo que explica la frecuencia alta de este serotipo. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que efectivamente, exista una alta frecuencia del serotipo A16 en la zona de estudio. Es conveniente señalar que en los trabajos mencionados, los aislamientos se realizaron a partir de lesiones neumónicas de animales adultos sacrificados en rastro y en este trabajo se obtuvieron de animales jóvenes muertos por un cuadro agudo de neumonía.

El tipo capsular de *Pasteurella multocida* más común descrito para bovinos es el A^{37,43}, lo cual también difiere con los resultados de este trabajo, donde el tipo capsular más común fue el D. Esto también puede explicarse por el origen de los aislamientos, ya que se obtuvieron de un solo brote de neumonías agudas en un misma explotación. Es importante señalar que *P. multocida* se caracteriza por producir bronconeumonías supurativas de tipo lobular de curso crónico, en este caso, los cuadros neumónicos se caracterizaban por ser del tipo pleuroneumonía fibrinosa aguda severa con un curso de 24 hrs como máximo, lo cual puede explicar la mayor frecuencia del tipo D. Sin embargo, el serotipo somático más común encontrado en éste estudio fue el 3, lo cual si concuerda con lo descrito en otros trabajos⁴.

La severidad de las lesiones encontradas no descartan la posibilidad de la interacción de otros agentes involucrados como virus y otros microorganismos, de los cuales no se intentó el aislamiento.

En este trabajo se observó que no existen diferencias estadísticas en cuanto a la capacidad de producción de leucotoxina entre los aislamientos provenientes de microbiota normal y de cuadros neumónicos agudos. Se observó que existe una mayor producción de leucotoxina en los aislamientos cuyo origen fue de pulmones neumónicos y menor para los de microbiota normal, esto concuerda con trabajos previos realizados en México⁴.

La mayor capacidad de producción puede estar relacionado con el origen, dado que es probable que las diferencias en microambiente entre la cavidad nasofaríngea y las del aparato respiratorio bajo permitan la variabilidad en la expresión de factores de virulencia, como la alta producción de leucotoxina, debida a la presencia de inductores *in situ* hasta ahora desconocidos, o bien a una más alta tasa de crecimiento de los aislamientos obtenidos de pulmones neumónicos. También es importante resaltar que estos aislamientos alcanzaron rápidamente una tasa alta de producción de leucotoxina, esto puede deberse a la capacidad de éstas bacterias para alcanzar en un corto tiempo la fase de crecimiento logarítmico que en teoría las haría más patógenas.

Algunos autores han realizado estudios comparativos entre diferentes cepas y serotipos, evaluando sus propiedades de capsulación, producción de leucotoxina *in vitro*, propiedades antigénicas y su capacidad para reproducir el cuadro neumónico, éstos autores concluyen que no existen diferencias significativas en el potencial patógeno de sus cepas, a pesar de haber diferencias en su toxicidad^{34,11}.

Para *Pasteurella haemolytica* se han determinado una gran variedad de factores de virulencia, entre las que se encuentran la leucotoxina, una proteasa neutra, hemolisinas, proteínas de membrana externa, proteínas reguladas por hierro, etc. La proteasa neutra hidrolisa específicamente sialoglicoproteínas y es una metalo - proteasa sin homología con otras proteasas de origen procariontico o eucariótico¹.

En el presente trabajo, se intentó determinar la presencia de otras proteasas de secreción de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida*, encontrándose actividad de proteasa en diferentes serotipos tanto de *P. multocida* como de *P. haemolytica*. Estas proteasas que se determinaron, pueden ser diferentes a la sialoglicoproteasa descrita para *P. haemolytica*, debido a que ésta tiene un peso molecular de 35 kd y la actividad de las proteasas determinadas en el presente trabajo se evidenció en moléculas mayores a 250 kd. Este efecto se demostró sobre gelatina grado reactivo, sin embargo, su especificidad no fue evaluada, por lo que se sugiere en estudios posteriores, evaluar los sustratos específicos de éstas proteasas, para determinar su efecto sobre sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro*, que pudiesen contribuir a entender mejor la patogenia de la enfermedad causada por *Pasteurella*.

Por ejemplo, para el caso de la sialoglicoproteína de *P. haemolytica*, ésta se ha caracterizado, clonado e incluso secuenciado, además de que se ha demostrado su efecto sobre glicoproteínas de la membrana de eritrocitos humanos y de otras moléculas de superficie de glóbulos blancos, como el CD34, CD43, CD44 y CD45², sin embargo, no se ha determinado su acción sobre eritrocitos, células endoteliales y macrófagos de bovinos, por lo que su participación en la patogénesis del daño pulmonar es incierta.

Para el caso de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, las proteasas descritas se han caracterizado y se ha determinado el sustrato al cual degradan. Las proteasas de éste microorganismo degradan componentes protéicos del huésped, facilitando su invasión, y la severidad de las lesiones en los pulmones de los cerdos expuestos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* podrían deberse al efecto de éstas proteasas. Estudios más profundos, demuestran la actividad de éstas enzimas sobre IgA porcina y humana, así como hemoglobina bovina, mostrando menor afinidad para ésta última. Su pH óptimo de actividad esta entre 6 y 7, son inhibidas al ponerlas en contacto con EDTA y reactivadas con calcio y, finalmente, son estables a 20 °C por más de un mes. Ésto demuestra, sin duda alguna, que para el género *Pasteurella*, la caracterización de sus proteasas de secreción pudiera realizarse de manera muy similar al género *Actinobacillus* sp. por pertenecer ambas a la misma familia.

Por otro lado, para *Pasteurella multocida*, en la literatura consultada, no existen informes de la presencia de proteasas de secreción, por lo que los hallazgos encontrados en éste trabajo, pueden tener una especial relevancia.

CONCLUSIONES

- Es evidente la participación de otros serotipos como el A16 de *Pasteurella haemolytica* a los comúnmente descritos en la literatura. Así mismo se pone de manifiesto la importancia del serotipo D de *Pasteurella multocida* ocasionando cuadros de pleuroneumonía fibrinosa severa.
- Los aislamientos de pulmones neumónicos, mostraron un aparente mayor efecto citotóxico comparado con los obtenidos de microbiota normal. Sin embargo, estadísticamente no hubo diferencia significativa.
- En *Pasteurella haemolytica* y *multocida* se demostró la producción de moléculas con actividad de proteasa diferente a la sialoglicoproteasa descrita para *P. haemolytica* debido al mayor peso molecular de las moléculas encontradas.

LITERATURA CITADA

- 1.- Abascal, N.E., Tenorio, R.V., Serrano, J.J., García, C.C., and De la Garza, M., 1994. Secreted Proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 Degrade Porcine Gelatin, Hemoglobin and Immunoglobulin A. Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
- 2.- Abdullah, K. M.; E. A. Udoh; P. E. Shewen & A. Mellors. 1992. A natural glycoprotease of *P. haemolytica* A1 specifically cleaves α -siialoglycoproteins. *Infect. Immun.* 60:56-62.
- 3.- Aguilar, I.C. y Tortora, P.J., 1989. Mortalidad en corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F., Memoria del II Congreso Nacional de Producción Ovina p. 146.
- 4.- Alanís, M. M. E., Bernardino, O. S. A., 1996. Evaluación de la Capacidad de Producción de Leucotoxina de Aislamientos de *Pasteurella haemolytica* Obtenidos de Ovinos con Diferentes Cuadros Neumónicos y de Microbiota Normal. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. De México.
- 5.- Aley, M.R. y Clarke, J.L., 1977. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. *N. Z. Vet. J.*, 25: 200.
- 6.- Argueta, G. J., 1986. Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, México, D.F.
- 7.- Ayala, A.D., 1988. Evaluación de fagocitosis, efecto bactericida y citotoxicidad de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* en macrófagos alveolares de bovinos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 8.- Biberstein, E.L., 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. En: Bergan, I. y Norris, J., *Methods in Microbiology*. New York Academic Press Inc., 10:253.

- 9.- Blanco, V. F. J., 1990. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones neumónicas en rumiantes domésticos. Tesis de maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México.
- 10.- 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.
- 11.- 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).
- 12.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Corsvet, R.E., Pummange, J.A., y Fulton, R.W., 1984. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, 45:2543.
- 13.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Fulton, R.W., Gentry, M.J. y Rummange, J.A., 1985. Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*, 46:342.
- 14.- Confer, A.W., Panciera, R.J. y Monsier, D.A., 1985. Inmunity to *Pasteurella haemolytica*. *J.A.V.M.A.*, 193:1308
- 15.- Cowan, S. T., Steel, J. K., 1981. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. Segunda edición. Cambrige University Press.
- 16.- 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. Microbiot.*, 4:11, 1933 - 1939.
- 17.- Davies, D. H., Dungworth, D. L., Humpreys, S. And Johnson, A. J., : Concurrent infection of lambs whit parainfluenza virus type 3 and *Pasteurella haemolytica*. *N. Z. Vet. J.*, 25: 263 (1977).
- 18.- Dereck, A.M., Simons, K.R., Confer, A.W, Panciera, R.J. y Clinkenbeard, K.D., 1989. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. *Infect. Immun.*, 57:711.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 19.- Durham, J.A., y Confer, A.W., 1986. Comparison of the antigens associated with saline solution, potassium thiocyanate, and sodium salicylate extracts. *Vet. Res.*, 47:1946.
- 20.- Frank, L. G. Y Wessman, G.e., 1978. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, 7:142.
- 21.- 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. Micobiol*; 22: 988.
- 22.- Gentry, M.L., y Richard, E., 1981. Extraction of capsular material from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*
- 23.- 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.
- 24.- González, C.T., and Maheswaran, S.K.: The role of induced factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: review and hypotheses. *Br. Vet. J.* , 149: 183 - 194 (1993).
- 25.- Green, G.M., 1971. In defense of the lung. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 102:691.
- 26.- Green, G.M., Jakob, G.J., Low, R.B. y Davis, G.S., 1977. Defense mechanisms of the respiratory membrane. *Am. Rev. Resp. Dis.* ,102:691.
- 27.- Güemes, S.F., 1995. Características Bacteriológicas del genero *Pasteurella*. Memorias del Seminario sobre Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, Nuevo León., México, p. 1.
- 28.- Hamdy, A.H., y Trapp, A.L., 1967. Investigation of nasal microflora of feedlot calves before and after weaning. *Am. J. Vet. Res.*, 28: 1019.
- 29.- Lea Master, B.R., Evermann, J.F., y Lehmkühl, H.D., 1987. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootic of respiratory tract disease in recently weaned lambs. *J.A.V.M.A.*, 190:1545.

- 30.- Lopez, A., Thomson, R.G. y Savan, M., 1976. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with Bovine Virus Diarrhoea or *Mycoplasma bovis*. *Can. J. Comp. Med.*, 46:302.
- 31.- Luna, L. G. . 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3er. De. Mac Graw - Hill Book Company. USA. p.36
- 32.- Martínez B.J : 1995. Efectos adversos sobre los mecanismos de depuración pulmonar del tracto respiratorio y su relación con Pasteurelisis Neumónica; Monterrey, Nuevo León., México.. *Memorias del Seminario sobre Pasteurelisis Neumónica del Ganado Bovino*. p. 10.
- 33.- Martínez, A., Cuellar, O.J., Hernández, J., Pijoan, A.P. y Tórtora, P.J., 1988. Estudios sobre situaciones que determinan la mortalidad en corderos, en ranchos del Estado de México. *Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina*. AMTEO. México. p. 176.
- 34.- Mayagoitia, L.A. . 1995. Morfofisiología del aparato respiratorio. *Memorias del Seminario sobre Pasteurelisis Neumónica del Ganado Bovino*. Monterrey, Nuevo León., México. p. 8-9
- 35.- Mellors, A., and R. Y. C. Lo. 1995. The O - sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* active against cell surface antigens. *Research topics: Biochemistry and enzymology of membrane processes*, especially in immunology and pathogenesis.
- 36.- Morales , A.J.F., 1995. Avances y perspectivas sobre inmunización contra la pasteurelisis neumónica en ovinos.
- 37.- Murales, A.J.F., 1991. Evaluación experimental y en campo de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. Tesis para maestría en Producción Animal ., Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 38.- Morales, A. J. F. , Espino, R. G. , Zepeda, M. O. O. , Sánchez - Mejorada, P. H. Y Trigo, T. F. . 1986. Seroprevalencia de anticuerpos anticitotoxina en suero de ovinos. *Memrias de Reunión de Investigación Pecuaria en México, 1986*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. SARH. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México, D.F.

- 39.- Morilla, G.A., y Bautista G.R.C., 1986. Manual de Inmunología. México. Edit, Diana. pp.52. 81.
- 40.- Murguía O.L., 1988. Mortalidad en corderos de razas tropicales del nacimiento al destete. Memorias del 1er Congreso Nacional de Producción Ovina. México. p. 173.
- 41.- Pass, D.A., y Tompson, R.G., 1971. Wide distribution of *Pasteurella haemolytica* type 1 over the nasal mucosa of cattle. Can. J. Comp. Med., 35: 181.
- 42.- Petras, S. F.; M. Chidambaram; E. F. Illyes; S. Froshauer; G. M. Weinstock & C. P. Reese, 1995. Antigenic and Virulence Properties of *P. haemolytica* leukotoxine mutans. Infect. Immun. 63:1033-1039.
- 43.- Prince, D.V., 1985. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from the respiratory tract of sheep in New Zeland. N. Z. Vet. J., 33:76
- 44.- Sánchez - Mejorada P. H., Zepeda, M. O., Espino, R. G., Morales, A. J. F., y Ioeza, C. M. E. 1986. Presencia de anticuerpos anticapsula y anticitotoxina de *Pasteurella haemolytica* en suero de bovino. Memorias Reunión de Investigación Pecuaria en México 1986. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. SARH. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Mexico, D. F.
- 45.- Shewen, P. E. & J. A. Conlan. 1993. *Pasteurella*, p. 216-225 In: C. L. Gyles & C. O. Thoen (eds). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 46.- Squire, P.G., Smiley, D.W., y Croskell, R.B., 1984. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. Infect. Immun., 45: 667.
- 47.- Suárez, G.F., 1995. Características Bacteriológicas del Género *Pasteurella*. Memorias del Seminario sobre Pasteurelisis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, Nuevo León., México, p. 1- 4
- 48.- Sutherland, A.D. y Donachie, W., 1986. Cytotoxin effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet. Microbiol.,11: 336

- 49.- Sutherland, A.D. y Redmond, J., 1986. Cytotoxin from ovine strain of *Pasteurella haemolytica*: Characterization studies and partial purification. *Vet. Microbiol.*, 11:336
- 50.- Trigo, F.J., 1987. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. En: *Ciencia Veterinaria* 4:1
- 51.- Trigo, F.J.: Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelisis pulmonar bovina. *Vet. Mex.*, 22: 131 - 134 (1991).
- 52.- Trigo., *Patología Sistémica Veterinaria.*, Edit. Mc Graw Hill., *Patología del Aparato Respiratorio.*, pp 128.
- 53.- Velázquez, O.V., Navarete, A.P. y Vera, C.H.E., 1987. Frecuencia de aislamiento de *Pasteurella haemolytica* y sensibilidad *in vitro* en cepas obtenidas de corderos de 0 - 90 días de edad en el valle de Toluca. *Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina, México.* p. 180.