



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLÁN

“Obtención de un antígeno de *Pasteurella multocida* de tipo “A” de conejo.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:  
IRMA MIREYA JUÁREZ MENESES

ASESORES  
DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIÁN CARRASCO  
Q.F.B. OSCAR TORRES ANGELES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2002

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 MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Obtención de un antígeno de Pasteurella multocida de tipo "A"  
de conejo"  
que presenta la pasante: Irma Mireya Juárez Meneses  
con número de cuenta: 8735840-1 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Enero de 2002.

PRESIDENTE	Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya	
VOCAL	M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez	
SECRETARIO	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Sofia González Gallardo	
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Andres Romero Rojas	

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios:** Por la alegría de permitirme llegar a este día en compañía de mis seres queridos.

**A MIS PADRES, EUFEMIA Y PEDRO:** Por su apoyo, cariño, paciencia y el gran esfuerzo realizado para el termino del presente trabajo.

**A MIS HERMANAS,** Martha, Rosa, Teresa y Aydee: Por sus consejos, su cariño y por los valores que me han inculcado.

**A MIS HERMANOS,** Albino, Benigno y Leopoldo: Por ser más que mis hermanos, mis mejores amigos.

**A MIS SOBRINAS Y SOBRINOS,** Carolina, Monserrat, Carmen, Gabriela, Mónica, Fabiola, Paola, Ivonne, Cristel, Jorge, Luis, Carlos, Marco A., Juan E., Omar, José M., Ivan, Leonardo, José A., y Luis A.: Por que el presente trabajo les haga comprender que el ser humano puede realizar los sueños más grandes que posee.

**A MIS CUÑADAS Y CUÑADOS,** Rosario, Guadalupe H., Guadalupe S., Pedro, Jorge, Tomas y Abel: Por ser parte de esta gran familia que amo.

**A LUIS MORALES:** Por su apoyo, cariño y por ser una persona especial en mi vida.

**A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN:** Por mi formación y por hacer de mí una persona de provecho.

**UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL A LA DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA:** Por su asesoría, apoyo, paciencia y consejos brindados para la culminación del presente trabajo.

**AL DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO:** Por la confianza y el apoyo incondicional que siempre me brindó.

**A OSCAR TORRES ANGELES:** Por su asesoría, apoyo y amistad.

**A LA 18ava. generación y en especial a Mercedes A., Guadalupe H., Verónica U., Irma B. y Claudia Y.:** Por su gran amistad, apoyo moral y por los momentos inolvidables que compartimos en la F.E.S. Cuautitlán.

**A: DAVID TRUJILLO, DAVID OLIVA, GABINO SÁNCHEZ** por su gran ayuda técnica.

**Este trabajo se desarrollo en las instalaciones del Laboratorio de Virología de la Coordinación General de Investigación y Estudios de Posgrado, bajo la asesoría de la Dra. Susana E. Mendoza Elvira, el Dr. Abel Ciprián Carrasco y del Q.F.B. Oscar Torres Ángeles.**

## INDICE

	Página
Resumen .....	i
1.0 Introducción .....	1
1.1 Morfología y Fisiología .....	2
1.2 Necesidades y características de cultivo .....	2
1.3 Estructura antigénica .....	3
1.4 Virulencia de <i>Pasteurella multocida</i> y susceptibilidad del hospedero .....	4
1.5 Factores de Patogenicidad .....	5
A) Endotoxina .....	5
B) Neuroaminidasa .....	5
C) Adhesina .....	6
D) Cápsula .....	6
1.6 Mecanismos de defensa del hospedero .....	6
1.7 Distribución y transmisión .....	8
1.8 Diagnóstico .....	9
A) Bacteriológico .....	9
B) Capsular .....	10
C) Somático (Serológico o Serotipificación) .....	11
1.9 Patogenia .....	11
1.10 Afecciones Producidas por <i>Pasteurella multocida</i> en conejos .....	11
A) Rinitis ( Coriza infecciosa) .....	12
B) Bronconeumonía .....	13
C) Otitis media .....	14
D) Infección Genital .....	15
E) Abscesos .....	16
F) Conjuntivitis .....	16
G) Septicemia .....	17
1.11 Prevención .....	17
1.12 Justificación del Proyecto de Tesis .....	20
2.0 OBJETIVOS .....	21
2.1 Objetivo General .....	21
2.2 Objetivos particulares .....	21
2.3 Hipótesis .....	21
3.0 MATERIAL Y METODOLOGIA .....	22
3.1 Identificación .....	22
3.2 Preparación del Reactivo de <i>Pasteurella multocida</i> tipo "A" .....	23
3.2 Preparación del Reactivo de <i>Pasteurella multocida</i> tipo "A" (Diagrama) .....	24
3.3 Obtención de sueros .....	25
3.4 Procedimiento del método Serológico: Aglutinación en Placa "Pasteurotest" .....	26
3.4.1 Interpretación del Método Serológico .....	26
3.4.2 Principios del Procedimiento .....	26
4.0 RESULTADOS .....	27
5.0 DISCUSION .....	29
6.0 CONCLUSIONES .....	32
7.0 REFERENCIAS .....	33

## 1.0 INTRODUCCION

Los organismos del género *Pasteurella* poseen una amplia gama de hospederos y causan enfermedades epidémicas y sistémicas en animales domésticos y aves. Los microorganismos pertenecientes a éste género son generalmente bacilos cocoides, cortos y gruesos, sin embargo, a veces se observan formas alargadas; generalmente son capsulado, sin embargo han sido encontrados algunos sin cápsula la mayoría de las especies son inmóviles y ninguna forma esporas. Son Gram negativos, tiñéndose mas intensamente en los polos, dando lugar a la llamada tinción bipolar que suele ser característica del grupo <sup>(8,10,19,20)</sup>

Todas las especies de este género crecen bien en medios comúnmente usados y en medios convencionales empleados para pruebas bioquímicas diferenciales. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37°C, son productores de oxidasa. La mayoría de los cultivos de las diferentes especies producen catalasa, pero solamente *Pasteurella anatipestifer* produce gelatinasa. El poder fermentativo de los carbohidratos de éstos microorganismos es muy limitado; aunque acidifican algunos azucars, nunca producen gas. <sup>(8,10,19,20,21)</sup>

El genero *Pasteurella* comprende un grupo extremadamente heterogéneo de organismos, pero solamente han sido reconocidas cuatro especies: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella ureae*.

*Pasteurella multocida* es un microorganismo de considerable importancia histórica, científica y económica. Es un microorganismo muy versátil, capaz de infectar a bovinos, ovinos y búfalos, también infecta cerdos, gatos, perros, así como aves silvestres y domésticas; es considerado como flora bacteriana normal en conejos, ratas y ratones <sup>(20,21,22)</sup>

La primera contribución importante sobre estos microorganismos fue aportada por Bollinger en 1978, investigando una enfermedad mortal que afectaba a los animales silvestres y al ganado bovino. El agente bacteriano del cólera aviar fue descrito por Rivolta en 1877, por Perroncito en 1879 y por Toussaint en el mismo año. La descripción más completa del cólera de las gallinas la hizo Pasteur en 1880. En los Estados Unidos, Salmón y Smith observaron la bacteria en 1880. Davaine y Gaffky en 1981, describieron el agente causal de la septicemia del conejo. Loeffler y Schütz estudiaron y describieron el agente causal de la septicemia porcina 1882. En 1885, Kit realizó un estudio comparativo de los agentes productores de cólera aviar, septicemia del conejo, cerdos, animales de caza y bovinos, llegando a la conclusión de que, en muchos aspectos, eran idénticos, les dio el nombre de *Bacterium bipolare multocidum*.

En 1886, Hueppe notó la semejanza de las enfermedades producidas por éstas bacterias ovoides bipolares, proponiendo el nombre de septicemias hemorrágicas para ellas.<sup>(14)</sup>

En 1887, Trevisan empleó el nombre de *Pasteurella*, como resultado de estudios comparativos, Rosenbusch en 1937 y Rosenbusch y Merchant en 1938, emplearon el nombre de *Pasteurella multocida* para los microbios típicos de las septicemias hemorrágicas.<sup>(8,23,70,71)</sup>

## 1.1 MORFOLOGIA Y FISILOGIA

*Pasteurella multocida* es un pequeño bacilo cocoide gram negativo de 1.4  $\mu\text{m}$  de tamaño; muestra una tinción bipolar característica del grupo cuando se tiñe con azul de metileno ó fucsina fenicada. Tras repetidos cultivos en agar, tiende a formar largos bacilos, resultando pleomórfico y dando origen a cadenas, filamentos y bacilos de varios tamaños. Generalmente poseen cápsula, la cuál puede variar en tamaño y composición. Carter, 1970 demostró, independientemente; la presencia de cápsulas de algunas cepas de ácido hialurónico. Las cápsulas pueden ponerse de Manifiesto por el azul de alcian y con tinciones negativas utilizando tinta china o nigrosina. Las cepas virulentas pueden perder su cápsula de resiembras continuas en medios artificiales<sup>(8,13)</sup>

## 1.2 NECESIDADES Y CARACTERISTICAS DE CULTIVO

*Pasteurella multocida* es un microorganismo aeróbico y anaerobio facultativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. El pH conveniente oscila entre 6 y 8.5, con un óptimo situado entre 7.2 y 7.4.

El empleo de medios a partir de proteínas digerida o proteasa de peptona, estimula el crecimiento del microorganismo. Puede cultivarse en caldo común, pero se obtiene mejor crecimiento cuando se adiciona sangre o suero. Crece bien en cajas de medio de infusión de cerebro y corazón (BHI), y en cajas de agar sangre; es un microorganismo no hemolítico, pero puede producir una tonalidad oscura del medio en áreas de gran crecimiento después de 48 a 72 horas de incubación. Los cultivos en agar sangre poseen un olor distintivo. Se reconocen tres diferentes tipos de colonias después de 24 horas de crecimiento en agar suero clarificado a 37°C. Cepas altamente virulentas que contienen un antígeno capsular polisacárido tipo-específico, que generalmente produce colonias lisas (L) de 1.0 a 1.5 mm de diámetro; que normalmente son fluorescentes a la transmisión de luz oblicua.



Las cepas mucoides (M) son aisladas con mayor frecuencia de los pasajes respiratorios normales o de infecciones crónicas. Estas colonias son largas, pudiendo llegar a medir 2 a 3 mm de diámetro. Estos aislamientos son generalmente de baja virulencia, poseen una gruesa cápsula formada por ácido hialurónico, pero pueden o no tener el antígeno capsular polisacárido tipo-específico. Las cepas rugosas (R) son completamente avirulentas y no poseen antígeno capsular. Las colonias son en apariencia similares a las colonias L, pero son difíciles de suspender en solución salina fisiológica. <sup>(8,14)</sup>

### 1.3 ESTRUCTURA ANTIGENICA

La clasificación serológica de *Pasteurella multocida* es más compleja de lo que se pensaba en un principio. La tipificación por el uso de procedimientos estándares de aglutinación, es usualmente complicado por la presencia de antígenos somáticos comunes y, en cepas mucoides por el ácido hialurónico capsular. <sup>(6,14)</sup>

Roberts (1947) fue el primero en demostrar la existencia de por lo menos 5 cepas tipo de *Pasteurella multocida*, basado principalmente en las pruebas de inmunidad cruzada para el ratón <sup>(5)</sup>

El sistema Serológico de agrupación más comúnmente utilizado proviene de la separación inicial en 4 serotipos realizada por Carter, basado en las diferencias de los antígenos capsulares. Para este propósito fue realizada una prueba de hemaglutinación indirecta, utilizando eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O como portadores de antígeno. Las células sensibilizadas con el polisacárido (antígeno K), fueron utilizadas para titular varios sueros anti- *Pasteurella multocida*, obteniéndose 4 tipos capsulares diferentes; los cuales fueron designados como tipo "A", "B", "C" y "D". Mas tarde, fue descrito un nuevo tipo; el "E" y el tipo "C" fue descartado. <sup>(7,9)</sup>

Roberts clasificó las cepas tipo como I, II, III y V las cuales corresponden respectivamente a los antígenos capsulares "B", "A", "E" y "D" de Carter. <sup>(7,8,9,10)</sup>

En general los grupos "A" y "D" muestran una gran cápsula y son altamente virulentos para pollos, pavos, cerdos, vacas y ratones. La relación existente entre la cápsula y la alta virulencia ha sido discutida por Carter, 1979. <sup>(8)</sup>

Existe una gran confusión en cuanto a la relación existente entre varios de los tipos capsulares, ya que además; *Pasteurella multocida* produce un gran numero de antígenos somáticos lipopolisacáridos, los cuales pueden ser detectados mediante pruebas de hemaglutinación, una vez que el antígeno capsular ha sido eliminado. <sup>(14)</sup>

El antígeno capsular puede ser eliminado por el tratamiento de las células con ácido clorhídrico normal durante toda la noche, o bien tratando las células con hialuronidasa que produce el mismo efecto que la hidrólisis ácida. <sup>(5,6,55)</sup>

Algunas cepas de *Pasteurella multocida* probablemente contienen antígenos somáticos múltiples de los cuales, hasta ahora, han sido identificados por lo menos 11 antígenos O específicos.

Ahora es costumbre el designar los aislamientos de *Pasteurella multocida* con un número arábigo para el antígeno somático específico, seguido por una letra capital designando el antígeno capsular, si este es conocido. <sup>(9)</sup>

#### 1.4. VIRULENCIA DE *Pasteurella multocida* Y SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDERO

La virulencia de las cepas de *Pasteurella multocida* en la variedad de especies de huéspedes primarios, varía desde los niveles altamente patógenos encontrados en las cepas patógenas de aves a la virulencia más modesta de cepas asociadas con neumonía bovina y porcina, e incluso la virtual avirulencia de las cepas aisladas de la mucosa oral de gatos y perros.

Las cepas virulentas de *Pasteurella multocida* pueden ser aisladas de pulmones bovinos aparentemente normales, las cuales, al parecer; desencadenan brotes epidémicos de septicemia hemorrágica causados por estas mismas cepas con la ayuda de estrés previo de los animales (por ejemplo: Frío, hacinamiento, o la presencia de una infección intercurrente), llegando a causar epidemias fatales. <sup>(78)</sup>

La virulencia extraordinaria mostrada por algunas cepas de *Pasteurella multocida*, esta relacionada con la habilidad de este microorganismo de evadir la fagocitosis una vez que penetra a los tejidos. Cuando se introduce parenteralmente en ratones normales, los bacilos se multiplican libremente por todos los tejidos al igual que si se encontraran en un medio de cultivo líquido *in vitro*. <sup>(14)</sup>

En consecuencia, virtualmente; todos los órganos y tejidos del cuerpo llegan a ser infectados masivamente en unas cuantas horas, dando como resultado, la muerte del huésped en menos de 24 horas debido a una endotoxemia fatal. <sup>(80)</sup>

La cavidad peritoneal también se puede ver involucrada, y los conteos diferenciales de los cultivos obtenidos por lavado peritoneal indican que más del 98% de los bacilos presentes se encuentran en la fase extracelular, sugiriendo que el mecanismo de fagocitosis no fue efectivo contra el microorganismo; el cuál continúa multiplicándose libremente dentro del fluido peritoneal y en la sangre hasta que el huésped muere.

La falta de fagocitosis en infecciones de *Pasteurella multocida* ha sido observada y reportada por varios investigadores<sup>(5,6,14)</sup>, considerándose que este fenómeno es debido en parte a que la cápsula que poseen las bacterias dificulta su fagocitosis y por otro lado, a la ausencia de opsoninas específicas en el organismo afectado, lo cual determina que los macrófagos del huésped no puede fagocitar los microorganismos en un grado que puedan proporcionarle protección. Cuando la infección entra directamente en la cavidad peritoneal, pasa rápidamente a los nódulos linfáticos mediastinales para llegar a la sangre en pocas horas. Después de 5 horas, la pared del sistema retículo endotelial se encuentra altamente involucrada y el animal se observa enfermo<sup>(80)</sup>.

## 1.5 FACTORES DE PATOGENECIDAD

Varios productos bacterianos, incluyendo endotoxina, neuraminidasa, adhesina y una cápsula antifagocítica, han sido descritos y pueden ser significativos en la virulencia de las cepas de *Pasteurella multocida*.

### A) ENDOTOXINA.

EN 1971 Wok expreso que la mayoría de las preparaciones de endotoxinas probablemente consistían de complejos o mezclas con proteínas fosfolípidos y lipopolisacáridos (Heddleston, 1975). En los conejos la endotoxina de *Pasteurella multocida* ha sido relacionada con fiebre, depresión del Sistema Nervioso Central, coagulopatía intravascular diseminada, leucopenia, trombocitopenia y muerte, también ha sido detectada una endotoxina libre en el plasma de conejos septicémicos<sup>(35,60,73)</sup>.

### B) NEURAMINIDASA

La producción de neuraminidasa está relacionada con la virulencia de algunas cepas de *Pasteurella multocida* observándose que las cepas de *Pasteurella multocida* de rápido crecimiento y una gran actividad de neuraminidasa son más virulentas que aquellas que crecen lentamente o que expresan una baja actividad enzimática. Sin embargo, el mecanismo de acción específico de la neuraminidasa de *Pasteurella multocida* se desconoce<sup>(2)</sup>.

### C) ADHESINA.

La capacidad de *Pasteurella multocida* para adherirse a células nasofaríngeas de conejo y a células de cultivo de tejidos descrita y se ha postulado su papel en la colonización y la infección en el conejo huésped<sup>(2,71)</sup>.

En un estudio realizado para comparar las propiedades de adhesividad de diferentes serotipos capsulares de *Pasteurella multocida* a células epiteliales, las cepas con cápsula del tipo "A" fueron aproximadamente 10 veces más adherentes *in vitro* a células HeLa que las cepas de tipo capsular "D" evaluadas. La adherencia fue destruida a la interacción de las fimbrias bacterianas con los receptores de N-acetil-D-glucosamina en la célula huésped<sup>(33)</sup>.

### D) CAPSULA.

Varias cepas de *Pasteurella multocida* tipo "A" poseen una cápsula de ácido hialurónico que inhibe la fagocitosis de éstos microorganismos por los neutrófilos polimorfonucleares<sup>(48)</sup>.

Sin embargo, hasta ahora; el papel específico que desempeña cada uno de esos productos en la patogénesis de la infección con *Pasteurella multocida* no son del todo claros.

## 1.6. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDERO

Glorioso y cols. (1982), sugieren que *Pasteurella multocida* prolifera inicialmente en la mucosa nasofaríngea debido a la producción de fimbrias y sustancias hemoaglutinantes que actúan como adhesinas<sup>(74)</sup>. El descubrimiento de fimbrias en el cultivo de una cepa adhesiva de *Pasteurella multocida* pero no en el cultivo de cepas no adhesivas sugiere que las fimbrias pueden actuar como organelos adhesivos. La bacteria se une a células epiteliales escamosas de la superficie mucosal, pero no a las células epiteliales ciliadas tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>(17,18,33)</sup>. La unión de *Pasteurella multocida* tipo "A", las células escamosas de la faringe resulta de la interacción de la fimbria bacteriana con receptores de N-acetil-D-glucosamina de la célula huésped<sup>(56)</sup>. Esta unión posiblemente juega un papel en la colonización y por consiguiente en la patogénesis de las infecciones en las vías altas del tracto respiratorio del conejo<sup>(33)</sup>.

*Pasteurella multocida* tipo "A" se adhiere a los macrófagos pulmonares de conejos, ratas, ratones, cerdos y caballos., Esslinger y cols., 1994, observaron que el ácido hialurónico aglutinaba macrófagos alveolares de diferentes especies animales, dicha adhesión se ve reducida por el tratamiento de la bacteria con hialuronidasa y/o por la preincubación de los macrófagos con ácido hialurónico<sup>(24,46,47)</sup>

La mayoría de los investigadores sugieren que la colonización de los conejos con *Pasteurella multocida* ocurre no antes de la doceava semana de edad, sin embargo; otros investigadores; Otros investigadores han presentado evidencias sugiriendo que la colonización se presenta a partir de la quinta o sexta semana de edad y tan tempranamente como los siete primeros días de edad<sup>(32,37)</sup>.

La respuesta inmunológica observada en las diferentes especies sometidas a la vacunación es predominantemente de naturaleza humoral. Es posible que el mosaico antigénico de *Pasteurella multocida* estimule tanto cualitativa como cuantitativamente diferentes clases de inmunoglobulinas en diversas especies de huéspedes<sup>(14)</sup>. La infección natural con *Pasteurella multocida* fue seguida por la detección de anticuerpos IgM e IgG, encontrándose que, en la mayoría de los conejos, estos anticuerpos son detectados de la segunda a la tercera semana después del último cultivo nasal negativo. La respuesta del anticuerpo de la clase IgM se ve incrementada después de la infección, regresando a niveles normales después de unas cuantas semanas, mientras que la respuesta de anticuerpos de la clase IgG continúa incrementándose y permanece elevada<sup>(19,20,21)</sup>.

Se ha observado que el suero inmune de conejo, contiene altos niveles de anticuerpos IgG y una pequeña cantidad de anticuerpos IgA contra *Pasteurella multocida*, lo cual reduce significativamente la prevalencia y severidad de la neumonía y el número de microorganismos en los pulmones de conejos desafiados homológamente, lo que demuestra que los anticuerpos IgG contra *Pasteurella multocida* juegan un papel importante en la protección de conejos contra infecciones del tracto respiratorio inferior, ya que se relacionan con la reducción significativa del número de microorganismos en la cavidad nasal y con la prevalencia de la colonización de *Pasteurella multocida* en otros órganos<sup>(45)</sup>.

La inhabilidad de los anticuerpos específicos contra *Pasteurella multocida* para proteger adecuadamente a conejos de un desafío subsecuente no es bien entendida. Se ha observado que los anticuerpos producidos en conejos contra antígenos capsulares específicos, puede proteger pasivamente a ratones inmunizados; aparentemente, esos anticuerpos de conejo son opsoninas efectivas, ya que los leucocitos polimorfonucleares de ratón realmente fagocitan y matan a la bacteria en presencia de ellos<sup>(36)</sup>.

Se han realizado ensayos para la medición de la fagocitosis de *Pasteurella multocida* en presencia de suero y de granulocitos obtenidos de conejos inmunizados y no inmunizados, observándose índices de fagocitosis bajos en ausencia de suero; sin embargo, la presencia de suero de conejos ya sea inmune o no incrementa el índice de fagocítico lo que sugiere que el suero mas complemento es esencial para la fagocitosis, ya que esta no ocurre en presencia de suero de conejo inactivos por calentamiento<sup>(36)</sup>. Sin embargo, la inhabilidad de los leucocitos polimorfonucleares de

conejo para controlar el crecimiento de *Pasteurella multocida* *in vivo* no se ha asociado con anomalías primarias de los neutrófilos o con una falta de eficiencia de las opsoninas séricas en animales infectados; por lo contrario, la resistencia de organismos capsulados a la acción bactericida del suero ha sido asociada con la virulencia bacteriana y la habilidad para producir bacteremia<sup>(66)</sup>.

Todo esto hace suponer que la producción de anticuerpos es facilitada por la estimulación sostenida de la respuesta inmune por los organismos colonizantes, confirmando las observaciones realizadas por otros investigadores, que sugieren que la colonización persistente puede ocurrir a pesar de la presencia de anticuerpos específicos<sup>(46)</sup>, desconociéndose hasta el momento la forma en la que esto ocurre, se piensa que se requiere de un mecanismo que ayude a evitar el efecto opsonizante de las inmunoglobulinas, para los aislamientos de cepas de *Pasteurella multocida* tipo "A", este mecanismo puede involucrar la cápsula mucoide, la cual puede inhibir la opsonización por la deposición restringida de inmunoglobulinas por el enmascaramiento de los sitios antigenicos. Esta posibilidad es congruente con los reportes que señalan que los aislamientos mucoides de *Pasteurella multocida* tipo "A" pueden resistir la fagocitosis de leucocitos polimorfonucleares de conejo<sup>(66)</sup>.

### 1.7. DISTRIBUCION Y TRANSMISION

La *Pasteurella multocida* se encuentra distribuida por todo el mundo y con frecuencia produce graves pérdidas económicas. Como se han aislado microorganismos a partir de los tractos respiratorio y digestivo de animales clínicamente sanos, se ha dudado con frecuencia de su papel como patógeno primario<sup>(8)</sup>.

La infección natural por *Pasteurella multocida* pueden adquirirla las diversas especies animales por diferentes formas, es muy probable que las garrapatas y las pulgas sean vectores naturales de la mayoría de infecciones en búfalos, cerdos, ovejas, zarigüeyas, perros y gatos<sup>(14)</sup>, se ha mencionado que la infección también puede ser transmitida por inhalación por contacto con animales infectados, por ingestión de agua y/o alimentos contaminados y por mordeduras de otros animales infectados.

En el humano, las infecciones causadas por *Pasteurella multocida* son generalmente debidas a mordeduras de animales portadores y por el contacto con animales y/o cadáveres de animales infectados tal es el caso de algunos granjeros trabajadores de abasto y veterinarios<sup>(2,8)</sup>.

## 1.8 DIAGNOSTICO

### A) BACTERIOLOGICO.

El diagnóstico bacteriológico definitivo del agente causal se basa en el aislamiento e identificación de *Pasteurella multocida*, para ello se requiere del cultivo de la muestra apropiada dependiendo del área afectada del conejo.

#### i) RINITIS (Coriza infecciosa)

En el caso de rinitis, el aislamiento y la identificación de *Pasteurella multocida* por el examen del cultivo bacteriano de exudado nasal mucoso o mucopurulento es esencial para realizar un diagnóstico definitivo. La inmunofluorescencia indirecta con especificidad para *Pasteurella multocida* se emplea como una prueba o tamiz tanto para la detección de antígenos (*Pasteurella multocida* en raspado nasal) y de anticuerpos en el suero de conejos<sup>(17,18,81)</sup>.

#### ii) BRONCONEUMONÍA

Debido a que los signos clínicos se confunden con los que producen otros microorganismos son usualmente irreconocibles, el diagnóstico de bronconeumonía en conejos depende de la examinación postmortem y del cultivo bacteriano de (los) pulmón(es) afectado(s)<sup>(18,25,26,34)</sup>.

#### iii) OTITIS MEDIA

El diagnóstico se realiza cuando se presentan casos de torticolis. La confirmación del diagnóstico se realiza por la demostración de un exudado supurativo en una o ambas cavidades timpánicas observadas en la examinación postmortem, seguida por la confirmación de la presencia de la bacteria una vez realizado el cultivo bacteriano del exudado presente<sup>(18,25)</sup>.

#### iv) INFECCION GENTAL.

El diagnóstico se realiza usualmente a través del examen postmortem. Las lesiones, acroscópicas y microscópicas típicas pueden verificarse por el aislamiento y la identificación de *Pasteurella multocida* en los órganos afectados<sup>(18,25,26)</sup>.

#### v) ABSCESOS.

La presencia de abscesos subcutáneos se determina por la presencia de una protuberancia focal con un centro blando. La aspiración del contenido de la protuberancia ayuda en la diferenciación del absceso con un tumor o una lesión parasitaria. El exudado de los abscesos subcutáneos es cultivado para determinar el agente etiológico específico. Los abscesos en órganos internos son generalmente reconocidos a la necropsia<sup>(18,25,26)</sup>.

#### vi) CONJUNTIVITIS.

Es necesario realizar el cultivo bacteriano del saco conjuntivo para identificar a la bacteria causal y determinar su sensibilidad a antibióticos<sup>(18,27)</sup>.

#### vii) SEPTICEMIA.

El diagnóstico depende del cultivo bacteriano y la identificación del organismo causal en sangre y en varios órganos parenquimatosos<sup>(18,27)</sup>.

Los medios de cultivo apropiados son aquellos enriquecidos con suero y/o sangre, en los cuales las colonias aparecen después de 24 horas de incubación a 37° C estas colonias presentan una coloración grisáceo, son redondas y de un tamaño moderado las cuales poseen un color característico; también se debe de considerar los siguientes parámetros: Motilidad, crecimiento en agar McConkey, producción de indol y oxidasa y la carencia de hemólisis en agar sangre<sup>(42)</sup>; 1990), así como las características bioquímicas citadas en la tabla 1.0<sup>(46)</sup>.

### B) CAPSULAR.

Para la identificación de los tipos capsulares "A" y "D", se pueden realizar dos métodos no serológico. Para la identificación del tipo capsular "A" se realiza la prueba de sensibilidad a la hialuronidasa estafilocócica, la cual se manifiesta como una disminución del tamaño de las colonias de *Pasteurella multocida* en la región adyacente a la línea estafilocócica debida a la difusión de hialuronidasa en el medio de agar sangre<sup>(7,12)</sup>. El otro, es un método de aglutinación rápida con acriflavina, para la identificación del tipo capsular "D"<sup>(9)</sup>.

En cuanto al tipo capsular común en conejos, se reporta que de un total de 79 aislamientos reportados, el 74 (94%) de ellos fueron del tipo "A" y 5 (6%) corresponden al tipo "D"<sup>(9)</sup>. (Chengappa y cols; 1982). En otro estudio, de un total de 10 aislamientos, el 60% fue tipo "A", el 30% tipo "B" y un 10% no fue tipificado por los métodos no serológicos<sup>(51,52)</sup>.



### C) SOMATICO (SEROLOGICO O SEROTIFICACION).

El diagnóstico serológico de los antígenos somáticos se realiza una vez que ha sido eliminado el antígeno capsular bacteriano por los métodos antes mencionados.

Los antígenos somáticos en general, son determinados por medio de pruebas de difusión en gel<sup>(6)</sup>. Este es un sistema de serotificación somática realizado por<sup>(35)</sup>, basado en la especificidad del lipopolisacárido purificado obtenido de las cepas de *Pasteurella multocida* observándose que poseen dos o más antígenos que reaccionan cruzadamente con sueros de referencia<sup>(50,51)</sup>.

En un estudio realizado por Chelgappa y cols., (1982) con un total de 79 aislamientos de *Pasteurella multocida* de conejos infectados, reportaron una reacción de precipitación más intensamente observada con el serotipo 12 en el 84% de la población. Por su parte DiGiacomo y cols., (1983), en un estudio de 48 cultivos de *Pasteurella multocida* de conejos, reportan que las mayores reacciones de precipitación observadas señalan a los serotipos 3 y 12 como los más prevalentes, cuantificando el 25% y el 77% de los aislamientos respectivamente<sup>(41)</sup>.

### 1.9 PATOGENIA:

*Pasteurella multocida* puede entrar a los pulmones a través de la tráquea o vía la ruta vascular sanguínea y causar neumonía enzootica. Se piensa que una infección respiratoria de las vías altas (la cual puede o no ser clínicamente aparente) precede a la otitis media y *Pasteurella multocida* asciende por la trompa de Eustaquio al oído medio causando infección, puede expandirse afectando el oído interno, así como las meninges y el parénquima cerebral. En cuanto a la conjuntivitis subaguda o crónica, en 1963 Lesbouyries sugirió que la bacteria puede alcanzar a penetrar el saco conjuntivo vía el conducto lagrimal<sup>(18)</sup>.

### 1.10 AFECCIONES PRODUCIDAS POR *Pasteurella multocida* EN CONEJOS

Los conejos son extremadamente susceptibles a la infección con *Pasteurella multocida* y puede llegar a presentar un gran número de formas clínicas de esta enfermedad.

La introducción y distribución de *Pasteurella multocida* en una colonia de conejos puede ocurrir cuando es adquirida una nueva colonia. La ausencia de enfermedad clínica en conejos portadores puede permitir la introducción de conejos infectados en la colonia. El organismo puede pasar rápidamente a través de los conejos susceptibles y producir una alta mortalidad<sup>(1,2)</sup>.

Hagen (1958) indicó que *Pasteurella multocida* puede diseminarse de la madre a sus descendientes por la vía respiratoria poco antes del nacimiento. Es muy factible que la infección nasal parecida a las demás formas clínicas de pasteurelosis y diseminación del agente bacteriano ocurra por varias rutas<sup>(34)</sup>.

### A) RINITIS (CORIZA INFECCIOSA)

La rinitis y la sinusitis paranasal se caracteriza por un exudado nasal seroso, mucoso o mucopurulento. En 1920, Ferry y Hoskins estudiaron la etiología de la rinitis encontrando un gran número de casos de *Pasteurella multocida* en conejos con rinitis sacrificados y a la necropsia, estos conejos presentaban congestión de la membrana mucosal y exudado mucopurulento<sup>(1)</sup>.

En 1923, McCartney y Olitsky reportaron que la rinitis consistía en la inflamación crónica de los pasajes nasales y los sinusoides paranasales; encontrando lesiones en un 10 a un 25% de conejos clínicamente sanos e indicando que esos portadores podían desarrollar una enfermedad clínica cuando sus defensas se debilitaran por el estrés debido a factores climáticos o experimentales<sup>(1,2)</sup>.

#### INCIDENCIA:

En 1924, Webster determinó que este microorganismo está presente en la cavidad nasal de conejos clínicamente sanos en un 60 a un 70% del total de individuos de una colonia. Existe poca información acerca de la incidencia de rinitis, pero se sabe que es una de las enfermedades comúnmente observada en conejos domésticos. Webster reportó una influencia estacional en la incidencia de rinitis, presentándose un mayor número de casos en otoño y primavera con una baja incidencia en el verano<sup>(79)</sup>.

#### SIGNOS CLINICOS:

La rinitis es clínicamente caracterizada por una grave secreción nasal mucoso o mucopurulenta. El exudado nasal comúnmente estimula al conejo a restregarse la nariz externa con las patas delanteras. El exudado causa humedad y pelo matizado en la zona<sup>(25,26)</sup>.

#### PATOLOGIA:

Los cambios patológicos dependen de la duración de la enfermedad y van desde agudos a crónicos, el exudado cambia de seroso a mucoso ó a mucopurulento, puede causar inflamación de la piel que circunda el área de la nariz y estar presente en los sinusoides nasales y paranasales. El revestimiento mucoso de estas cavidades puede

ser rojizo y edematoso. En los cambios microscópicos se observa congestión de los vasos sanguíneos y edema de la submucosa<sup>(18,34)</sup>.

#### ETIOLOGIA:

En 1887 el Dr. Theobald Smith aisló y describió el microorganismo de la septicemia fatal con pleuritis fibrosa en conejos, que coinciden con la descripción presente de *Pasteurella multocida*. En 1925, Webstern demostró claramente que la bronconeumonía del conejo está asociada con *Pasteurella multocida*<sup>(1)</sup>.

### B) BRONCONEUMONIA

#### INCIDENCIA:

En 1958 Hagen reportó que 35 (4%) de 857 conejos jóvenes sujetos a estudio desarrollaron infección respiratoria y muerte. Lu y cols., 1978 reportan casos de bronconeumonía en un 23% de 3210 conejos que murieron. La mayoría de los casos de bronconeumonía ocurre en conejos de 4 a 8 semanas de edad; sin embargo, el 53% de las muertes en animales maduros son causadas por esta enfermedad, además de que se ha observado que hay una diferencia significativa en la incidencia de dicha enfermedad en conejos de diferentes áreas geográficas<sup>(34,43)</sup>.

#### EPIZOTIOLOGIA:

*Pasteurella multocida* puede entrar a los pulmones a través de la tráquea por la ruta vascular sanguínea. La distribución de la mayoría de las lesiones graves sugieren que la vía intratraqueal es más común<sup>(18,26)</sup>.

#### SIGNOS CLINICOS:

Los cambios clínicos de bronconeumonía en conejos son raramente observados en la enfermedad adquirida naturalmente. Los primeros indicios de la enfermedad son anorexia y depresión. Es muy común encontrar animales muertos que se encontraban aparentemente sanos el día anterior<sup>(18,26)</sup>.

#### PATOLOGIA:

Los cambios observados varían de acuerdo a la duración y la severidad de la enfermedad. Las lesiones pueden afectar cualquier porción de los pulmones, sin embargo; las áreas anteroventrales son las más afectadas. Las lesiones más graves han sido divididas en 4 categorías, incluyendo consolidación, atelectasis, abscesos y pequeños focos nodulares grises<sup>(18,26)</sup>. La enfermedad se inicia con una reacción de inflamación aguda reconocida como consolidación. Puede presentarse hemorragia en

el parénquima pulmonar y la fibrina puede cubrir la superficie pleural<sup>(27)</sup>. Las lesiones consolidadas varían de bronconeumonía purulenta a fibrinopurulenta. Se observa bronconeumonía, multifocal necrotizante con edema extensivo y hemorragia. Las paredes alveolares pueden estar engrosadas y se observan macrófagos en los alvéolos. Los nódulos linfoides están generalmente rodeados de vasos sanguíneos<sup>(13,65)</sup>.

### C) OTITIS MEDIA

En la literatura antigua, fue conocida como la enfermedad del cuello doblado, debido a las observaciones clínicas de tortícolis (Flatt, 1974). Webster (1924) encontró que la otitis media estaba relacionada con la sionusitis y otras manifestaciones clínicas causadas por *Pasteurella multocida*<sup>(27,77)</sup>.

#### ETIOLOGIA:

En una serie de casos reportados de otitis media *Pasteurella multocida* fue aislada en 88 de 91 (97%) conejos infectados<sup>(30)</sup>. En otros estudios *Pasteurella multocida* fue aislada en 25 (80%) conejos afectados. En algunos casos de tortícolis, las cavidades timpánicas parecen normales en la examinación postmortem, los cultivos bacterianos no aportan información significativa, observándose afectados el oído interno y el cerebro<sup>(18,27)</sup>.

#### INCIDENCIA:

Se sabe que la otitis media ocurre comúnmente, sin embargo; hay una baja información en cuanto a su incidencia. Fox y cols. (1971) reportan que aproximadamente el 2% de las colonias desarrollan tortícolis. Generalmente el oído medio del conejo no es examinado a menos que presente tortícolis, por lo que, la única información disponible es la incidencia de tortícolis. La otitis media se presenta en colonias de conejos que poseen *Pasteurella multocida* endémicamente<sup>(18)</sup>.

#### SIGNOS CLINICOS:

La tortícolis se considera un hallazgo clínico primario en casos conocidos, pero se sabe que es el resultado de la diseminación de la infección localizada al oído interno (otitis interna) o a una parte del cerebro por tortícolis media simple. El tortícolis es observado en diversos grados, en los casos más severos, los conejos pueden perder la dirección normal de la cabeza, la cual sufre inclinación hasta que descansa cerca del recinto original. En los casos severos, los conejos pueden ser incapaces de comer o beber adecuadamente, perdiendo peso y sufriendo deshidratación. La incoordinación y otros signos nerviosos pueden aparecer cuando las meninges y el cerebro son afectados como resultado de la expansión de la infección<sup>(18,27)</sup>.

## PATOLOGIA:

Las lesiones más graves asociadas con la otitis media consisten de un exudado blanco o cremoso presente en una o ambas cavidades timpánicas, el revestimiento epitelial puede contener células gigantes y linfocitos e infiltrado de células plasmáticas en la submucosa. Ocasionalmente, la membrana timpánica se rompe, y el exudado supurativo es liberado en el canal del oído interno, o al cerebro, resulta en meningoencefalitis supurativa. Los conejos con otitis interna pueden mostrar una considerable pérdida de peso<sup>(18,27)</sup>.

## D) INFECCION GENTAL.

La infección genital en conejos incluye metritis o piometría en la hembra y orquitis y epididimitis en el macho<sup>(38,43,69)</sup>, *Pasteurella multocida* es comúnmente aislada de los órganos afectados, en cultivos puros. La infección genital es poco frecuente pero es observada con regularidad. Esta enfermedad se presenta en conejos maduros y adultos jóvenes, siendo más frecuentemente observada en hembras y con menor frecuencia en machos, la transmisión venérea ocurre cuando los machos infectados se aparean con hembras no infectadas ó viceversa. No se sabe si en agente etiológico es inseminado en la hembra con la eyaculación ó por el contacto previo con el prepucio infectado<sup>(18,25,38,43,69)</sup>.

## SIGNOS CLINICOS:

Los machos con infección aguda y subaguda son raramente observados pero las hembras pueden tener una secreción vaginal serosa o mucopurulenta. Pudiendo llegar a la formación de abscesos en la trompa del útero. Por supuesto, si ocurre la septicemia como parte de la infección aguda, el resultado puede ser fatal. En infecciones crónicas no se observan signos clínicos manifiestos. Las hembras pueden fracasar en la concepción por varias cranzas. Los machos pueden tener inflamados uno o ambos testículos<sup>(18,25,27,71)</sup>.

## PATOLOGIA:

En las hembras, el útero puede estar ligero o extensamente dilatado. En el útero afectado agudamente, la dilatación es leve y se observa un exudado grisáceo acuoso. Si el útero es afectado en forma crónica, se observa grandemente dilatado, y la pared uterina delgada. El color del lumen se relaciona con la presencia de una secreción densa color crema. En algunos casos, solo la porción anterior del útero contiene exudado. El exudado supurativo puede adherirse al endometrio del útero y microscópicamente, el epitelio se observa ulcerado con un infiltrado de leucocitos

polimorfo nucleares en la lamina propia. La naturaleza en las lesiones de los genitales de los machos no es del todo clara. Se han observado testículos agrandados con abscesos; sin embargo, debido a que no han sido realizadas descripciones detalladas, la localización exacta de los abscesos es incierta. Se considera que tanto el epidídimo como los testículos pueden ser el sitio de infección inicial<sup>(18,25,27,71)</sup>.

Los abscesos subcutáneos han sido descritos en conejos provenientes de colonias con antecedentes epidémicos de bronconeumonía y sinusitis<sup>(18,244,69,77)</sup>.

## E) ABSCESOS

### EPIDEMIOLOGIA:

Los agentes bacterianos pueden alcanzar un sitio apropiado para formar abscesos por: (a) contaminación externa, tal como rasguños o mordeduras de otros conejos ó alambres afilados en las cajas; (b) expansión septicémica a sitios distantes de la infección en el cuerpo o (c) por expansión directa de la infección, como es el caso de la infección expandida del oído al cerebro<sup>(18,26,27)</sup>.

### SIGNOS CLINICOS:

Los edemas subcutáneos que varían en tamaño, son asociados con abscesos en el sitio; sin embargo no están asociados comúnmente con la presencia de éstos órganos internos. como en otras manifestaciones clínicas de Pasteurelosis, la septicemia y la muerte pueden seguir al desarrollo de abscesos<sup>(18,27)</sup>.

### PATOLOGIA:

Los abscesos causados por *Pasteurella multocida* no son únicos en su gravedad ó apariencia microscópica. Usualmente, contiene exudado espeso y cremoso de coloración blanca a marrón, que puede estar rodeado por una capsular fibrinosa, dependiendo de la duración de la enfermedad<sup>(18,27)</sup>.

## F) CONJUNTIVITIS

La conjuntivitis causada por *Pasteurella multocida*, ha recibido poca atención, la incidencia de ésta forma clínica de la enfermedad se desconoce; sin embargo, es bastante común. Lesbouyries (1963), sugirió que la bacteria puede alcanzar a entrar al saco conjuntivo vía el ducto nasolagrimal y causar una conjuntivitis subaguda ó crónica. Pueden ser afectados tanto conejos maduros como jóvenes<sup>(18,27)</sup>.

**SIGNOS CLINICOS:**

Los párpados pueden estar moderadamente hinchados y cerrados por causa del exudado presente que puede llegar a ser mucopurulento y conjuntiva se observa enrojecida, pudiendo presentar una mucosidad severa<sup>(18,27)</sup>.

**G) SEPTICEMIA.**

La septicemia causada por *Pasteurella multocida* puede ser una secuela de cualquiera de las otras formas clínicas de Pasteurelosis, o puede ocurrir previamente a su desarrollo. La septicemia asociada con catarro nasal, broconeumonía y pleuritis es reportada con menor frecuencia en asociación con algunas de las otras formas clínicas<sup>(18,27)</sup>.

**SIGNOS CLINICOS:**

Los signos clínicos no son usualmente observados, ya que el animal afectado muere rápidamente. Si están presentes otras formas de Pasteurelosis, pueden observar los signos clínicos asociados con cada uno de ellas<sup>(18,27)</sup>.

**PATOLOGIA:** Así como en otros animales moribundos puede haber congestión de los órganos abdominales y torácicos con hemorragias debajo de las membranas serosas y subcutáneamente<sup>(18,27)</sup>.

**1.11 PREVENCIÓN.**

Existen diferentes métodos profilácticos para la prevención de la Pasteurelosis de tipo biológico, medicamentoso, de manejo, o una combinación de ellos con resultados variables<sup>(4,5,41)</sup>. Hasta ahora, el método profiláctico más usado contra la Pasteurelosis en diferentes especies animales es la inmunización, ésta se puede realizar con los siguientes biológicos<sup>(47)</sup>:

- a) Bacterinas (acuosas o suspendidas en emulsiones aceite-agua o adicionadas de un adyuvante)
- b) Extractos celulares bacterianos, los cuales contienen predominantemente endotoxinas o un polisacárido capsular parcialmente purificado.
- c) Vacunas vivas atenuadas cultivadas *in vitro* sobre medios de cultivo artificiales.
- d) Vacunas o bacterinas elaboradas en tejidos vivos tales como ratones, embriones de pollo, etc.

En general, las vacunas comerciales consisten en una mezcla de los serotipos más comunes de *Pasteurella multocida*, en raras ocasiones se encuentran disponibles en el mercado las bacterinas de *Pasteurella multocida* sola, ya que la mayoría de las veces son encontradas combinadas con otras bacterias, tales como *Pasteurella haemolytica*, *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* e inclusive con virus comúnmente asociados con pasteurolosis bovina como es el caso de la Parainfluenza 3.

Las bacterinas comerciales solo contienen unas cuantas de las cepas disponibles, por lo que no es de sorprender que aún no se haya realizado una vacuna atenuada altamente eficaz, la cual ofrezca protección contra esta bacteria altamente invasiva<sup>(72)</sup>.

Los resultados hasta hoy obtenidos han sido diferentes debido a las variaciones en los serotipos de una a otra zona y a los diferentes factores que deben tomarse en cuenta para llevar a cabo una inmunización eficaz tales como:

- a) La dosis de antígeno que penetra en el organismo del animal depende del antígeno.
- b) El número de estímulos utilizados para la inmunización, ya que como sabemos no importa cuán buena sea una vacuna o bacterina, la aplicación de una sola dosis de antígeno resulta en una protección no significativa comparada con la observada cuando se aplica una segunda dosis, por lo cual se recomienda la aplicación de por lo menos dos dosis de antígeno. Sin embargo debe tenerse cuidado con el número de estímulos realizados, ya que Skaletsky y cols. (1982) así como DeJong (1992), demostraron que mientras que dos o tres inmunizaciones dan como resultado la presencia de linfocitos antígeno-reactivos en la sangre y en el bazo, seis inmunizaciones reducen la respuesta antígeno específica hasta los niveles observados en animales control no inmunizados. Estos resultados son compatibles con los estudios reportados, por Gershon y cols. (1974), en los cuales existen supresores inespecíficos de las células T en ratas y ratones a los cuales se le administró una dosis masiva del antígeno<sup>(3,17,31,67)</sup>.
- c) El vehículo con el que se administra el antígeno, se ha observado que las vacunas o bacterinas administradas en emulsiones oleo-acuosas o acompañadas de sustancias adyuvante, no solo incrementan la duración de la respuesta inmune sino también aumentan notablemente el nivel del pico de protección obtenido experimentalmente comparadas con aquellas vacunas o bacterinas que son administradas en solución acuosa.



- d) La vía de administración del antígeno, existen vías de administración por las cuales los antígenos son eliminados del organismo más rápidamente, como es el caso de la vía intravenosa, por otro lado; existen vías que por tener una escasa irrigación sanguínea, impiden la adecuada absorción del antígeno, por lo cual la respuesta inmune resulta insuficiente para brindar protección al huésped, tal es el caso de la vía intradérmica<sup>(57)</sup>.

En cuanto al tratamiento medicamentoso contra la Pasteurelosis, Fox (1971) reportó el tratamiento de siete casos de torticolis con penicilina, donde solamente uno de ellos logró responder adecuadamente al tratamiento, sin embargo no indican la dosis usada. En el caso de abscesos subcutáneos, estos pueden ser abiertos con un bisturí, drenados y tratados con antibióticos tópicos o una solución de lugol<sup>(30)</sup>.

El tratamiento de la conjuntivitis consiste de ungüentos oftálmicos de antibióticos tales como penicilina y cloranfenicol, disponiéndose poca información en cuanto a la prevención de otitis media<sup>(26)</sup>. En cuanto a la sinusitis y la bronconeumonía, ha sido utilizada una combinación de 2 o más antibióticos, tales como 400,000 unidades de penicilina y ½ g de estreptomina para tratar a los conejos de forma individual. La sulfaquinoxalina ha mostrado ser efectiva en el tratamiento de rinitis y bronconeumonía cuando se emplea un rango de 225 g de medicamento por tonelada de alimento. Similarmente, la furazolidona es empleada en cantidades de 50 g por tonelada de alimento<sup>(34)</sup>. Con este tipo de tratamientos, ha sido observada la remoción de signos clínicos, sin embargo; el retiro de los antibióticos es acompañado de la recurrencia de la enfermedad<sup>(26)</sup>, por lo que la prevención de la Pasteurelosis en conejos incluye también el establecimiento de colonias libres de *Pasteurella*<sup>(64)</sup>, y la remoción de portadores identificados por cultivos repetidos de muestras nasales para *Pasteurella multocida*<sup>(18,27)</sup>.

## 1. 12 JUSTIFICACION DEL PROYECTO DE TESIS

La pasteurolosis pulmonar en conejos, es una enfermedad que año con año causa severas pérdidas económicas en el sector cunicola en el mundo, y aún cuando ha sido objetos de muchas y profundas investigaciones al respecto, hoy en día la etiología de la enfermedad continua siendo motivo de gran controversia.

En los conejos, la infección da las partes craneal y caudal del tracto respiratorio son los más comunes, pero pueden presentarse otras condiciones clínicas severas. De los 4 tipos capsulares y 16 serotipos somáticos descritos, los serotipos capsulares "A" y "D" y los serotipos somáticos 3 y 12 son los mas comúnmente asociados con infecciones de conejos.

La infección con *Pasteurella multocida* resulta en una pérdida económica general debido al bajo porcentaje de concepción y una alta mortalidad observada en las colonias de conejos infectados. Se dispone de poca información respecto a la edad en la cual los conejos inmaduros llegan a infectarse en forma natural con esta bacteria. El conocimiento acerca de la infección temprana y la edad a la cual los conejos desarrollan una inmunidad humoral activa contra *Pasteurella multocida*, puede resultar útil en el esfuerzo para reducir la incidencia de la enfermedad.

Un camino para eliminar la Pasteurelosis en conejos es mediante el desarrollo de una vacuna efectiva y segura, sin embargo; hasta el momento esto no ha sido posible debido probablemente, a la compleja antigenicidad exhibida por dicha bacteria. Por otra parte, los agentes quimioterapéuticos tales como la penicilina son marginalmente efectivos y no logran eliminar el microorganismo del tracto respiratorio.

Por todo lo anterior, con el presente trabajo se pretende realizar una prueba rápida y de fácil elaboración basada en la especificidad del serotipo capsular de *Pasteurella multocida* que nos ayude a evaluar granjas cuniculas, mediante una prueba de aglutinación en placa que ayude a detectar animales portadores e infectados con dicho microorganismo permitiéndonos así aportar tratamientos alternativos y opciones diferentes encaminadas a erradicar la enfermedad causada por *Pasteurella multocida*.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL.

Diseñar un método serológico para el diagnóstico de la coriza infecciosa y de la bronconeumonía crónica del conejo producida por *Pasteurella multocida* tipo "A" específica de conejo.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

-Aislar e identificar una cepa de *Pasteurella multocida* tipo "A".

- Preparación de un reactivo de aglutinación específico de *Pasteurella multocida* tipo "A".
- Evaluar la prueba de aglutinación en placa denominada "Pasteurotest" con los sueros de los conejos muestreados y el reactivo de aglutinación preparado.
- Aportar posibles tratamientos y opciones para erradicar la pasteurolosis de las granjas cuniculas.

### 2.3 HIPOTESIS

" Obtener un antígeno específico de *Pasteurella multocida* tipo "A" de conejo, entonces y evaluar una granja cunicula para observar la incidencia de dicha enfermedad y aportar posibles opciones para su erradicación".

### 3.0 MATERIAL Y METODOLOGIA

La cepa bacteriana se obtuvo de un conejo clínicamente normal perteneciente a la granja cunicula de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, ubicada en Cuautitlán Izcalli, Estado de México; en donde la cepa de *Pasteurella multocida* es endémica. Dicho conejo fue sacrificado por desnucación, después de lo cual se procedió a recolectar tanto su pulmón como su hígado, los cuales fueron tratados de la siguiente manera:

a) Se procedió a tener una superficie limpia y en condiciones asépticas, para lo cual se limpió la superficie de trabajo con fenol al 10% y con la ayuda de dos mecheros Bunsen. b) A cada muestra obtenida se le colocó una espátula caliente con el objeto de esterilizar superficialmente una pequeña área de la muestra. c) Con unas tijeras flameadas y ayudado con unas pinzas de disección, se cortó sobre la superficie esterilizada un trozo de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, con el que se hizo una impronta sobre el extremo de una placa de agar sangre. D) A partir del punto de la impronta y con la ayuda de un asa de platino estéril se llevó a cabo una siembra por estrías sobre la superficie del medio de cultivo, esto se realizó por triplicado de diferentes partes de cada órgano. E) También se realizó el sembrado de las secreciones de los cornetes nasales del conejo en placas de agar sangre con la ayuda de un hisopo estéril. F) Las placas sembradas se incubaron a 37 °C durante 24 horas al cabo de las cuales fueron retiradas de la incubadora bacteriológica y seleccionadas aquellas en las que se observó desarrollo bacteriano. g) Sobre las placas de agar sangre, en las que se obtuvo desarrollo, se seleccionaron aquellas colonias cuyas características morfológicas coincidieran con el género *Pasteurella*. H) De cada una de las colonias seleccionadas se realizó una tinción de Gram y se observaron las características tintoriales y la morfología bacteriana. I) Aquellas colonias que morfológicamente y tintorialmente presentaban características de *Pasteurella multocida* fueron resembradas por la técnica de dilución de colonias hasta obtener un cultivo puro.

### 3.1 IDENTIFICACION

Del cultivo puro se realizaron las pruebas bioquímicas necesarias para confirmar la identificación de *Pasteurella multocida*, las cuales fueron: prueba de motilidad, carencia de hemolisis en agar sangre, producción de indol, oxidasa, urea, glucosa, lactosa, sucrosa y manitol<sup>(1)</sup>.

La cepa de *Pasteurella multocida* tipo "A" fue identificada utilizando una cepa de *Staphylococcus aureus* productor de hialuronidasa, según la técnica de Carter (1975): a) Cada cultivo de *Pasteurella multocida* a examinar fue sembrado en agar sangre por dilución sobre toda la superficie de la placa con una separación entre líneas de 3 a 5 mm. B) A manera de cruzar la estria sembrada en la placa se inoculó otra línea con la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* productor de hialuronidasa. C) Las placas sembradas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. D) Transcurridas las 24 horas se retiraron las cajas de la incubadora bacteriológica y se realizó la lectura dando como positivo tipo "A" de *Pasteurella multocida* aquellos cultivos cuyas colonias presentarán una disminución de tamaño en las zonas adyacentes a la línea de desarrollo del *Staphylococcus aureus*<sup>(7)</sup>, confirmando la identificación para la obtención de un resultado negativo a la prueba de precipitación con acriflavina.

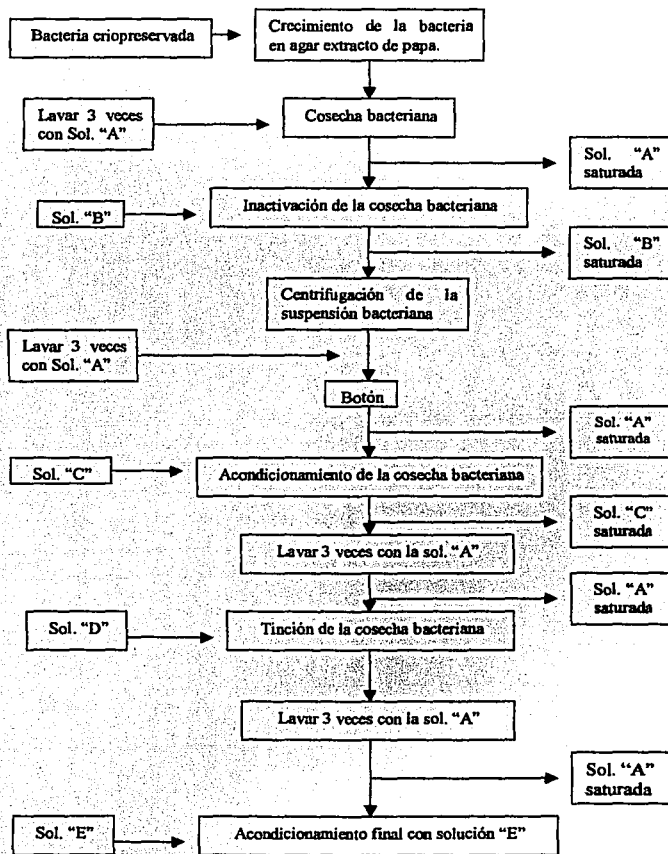
La identificación de *Pasteurella multocida* tipo "D" se realizó según la técnica de Carter y Subronto (1973) de la siguiente manera: a) De los cultivos puros identificados como *Pasteurella multocida*, se tomó una asada para inocular tubos de infusión de cerebro y corazón (BHI) contenido en un tubo de ensaye. B) Los tubos inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas. C) Al retirar los tubos inoculados de la incubadora se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. D) Después de la centrifugación. Se eliminó cuidadosamente 2.5 ml del sobrenadante. E) Se procede a resuspender el sobrenadante y se le adicionan 0.5 ml de solución de acriflavina. F) Los tubos se dejaron reposar durante 30 minutos, al cabo de los cuales se realiza la lectura de la prueba dando como positivos de *Pasteurella multocida* tipo "D", aquellos que presentan un precipitado grueso y que no mostró una reducción en el tamaño de sus colonias provocado por la hialuronidasa<sup>(7,9)</sup>.

### 3.2 PREPARACION DEL REACTIVO DE *Pasteurella multocida* TIPO "A"

Se sembró el cultivo puro de *Pasteurella multocida* tipo "A" de placas de agar sangre a placas de agar BHI hasta obtener un crecimiento aceptable en éste medio de cultivo, realizándose posteriormente la siembra de la cepa en placas de agar nutritivo y por último en placas de agar extracto de papa, después del cual se procede a realizar pruebas de identificación para corroborar que se trataba de *Pasteurella multocida* tipo "A" y que se encontraba libre de cualquier contaminación.

Una vez realizado el crecimiento de la bacteria en placas de agar extracto de papa, se procedió a sembrar masivamente 40 placas de agar extracto de papa con *Pasteurella multocida* tipo "A", incubándolas a 37 °C durante 10 a 24 horas, después de las cuales se llevó a cabo la cosecha bacteriana en condiciones asépticas de la siguiente manera:

**Diagrama 1. Preparación del reactivo de *Pasteurella multocida* tipo "A"**



\*Nota: las soluciones utilizadas en la preparación del reactivo forman parte del secreto industrial de la patente.

A) Se colocaron de 4 a 5 ml de solución salina fisiológica estéril en cada placa del extracto de papa. B) Se raspó la superficie del agar con la ayuda del borde de un portaobjeto estéril. C) Se cosechó la bacteria con la ayuda de una jeringa estéril y se colocó en un frasco de vidrio estéril. D) Para verificar si hubo contaminación con algún otro microorganismo, se realizó una tinción de Gram y se observó al microscopio. E) El cultivo cosechado se centrifugó a 5,000 r.p.m. durante 10 minutos para obtener el paquete celular con el cual se preparó el reactivo de *Pasteurella multocida* tipo "A".

### 3.3 OBTENCION DE SUEROS

Una vez obtenido el antígeno específico de *Pasteurella multocida* tipo "A", se procedió a hacer un muestreo en forma aleatoria la granja cunicula de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 ubicada en Romero Rubio, Estado de México. Se hicieron un muestreo un total de 131 conejos en diferentes etapas de desarrollo (ver Cuadro 1)

**Cuadro 1. Número de conejos muestreados en forma aleatoria en las diferentes etapas de desarrollo**

ETAPA DE DESARROLLO	No. DE CONEJOS MUESTREADOS
Destete	16
Gazapo y destete	26
Engorda	29
Remplazo	20
Vientres	20
Sementales	20

**Para la obtención de las muestras de suero, se trabajó de la siguiente manera:**

a) Se inmovilizó al conejo sujetándolo de las patas delanteras y traseras. B) Se localizó vena marginal de la oreja y una vez perfectamente identificada, se procedió a desinfectar la zona de punción con la ayuda de torundas de alcohol. C) Se pinchó la vena de elección con una aguja de 21x32 mm y se recolectó por capilaridad 1 ml de sangre en tubos para micro centrifuga. D) Los tubos se dejaron reposar durante 10 o 15 minutos y una vez formado el coagulo, se procedió a centrifugar cada muestra de sangre colectada a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. E) Se separó el suero colocándolo en tubos Eppendorf y las muestras se almacenaron en refrigeración.

### **3.4 PROCEDIMIENTO DEL METODO SEROLÓGICO: AGLUTINACION EN PLACA "PASTEURTEST"MR**

El método serológico se realizó como sigue:

- A) Se dejó estabilizar el frasco que contiene el antígeno de *Pasteurella multocida* tipo "A" a temperatura ambiente (12 a 25°C) durante 15 minutos.
- B) Se depositó una gota de suero con la pipeta de muestra en una de las celdas o pozos de la placa.
- C) Se colocó una gota del reactivo de aglutinación en la celda que contiene la gota de suero a diagnosticar.
- D) Se incorporó la mezcla con movimientos rotatorios utilizando un palillo mezclador.
- E) Se tomó la placa de las esquinas con los dedos índice y pulgar de ambas manos y se agitó la placa suavemente con movimientos ondulatorios durante 2 minutos.
- F) Después de que la placa ha sido agitada a temperatura ambiente, se hace la lectura durante los primeros 4 minutos.

#### **3.4.1 INTERPRETACION DEL METODO SEROLÓGICO**

La interpretación de la lectura de la prueba se realizó antes o al término de los 4 minutos. El procedimiento fue el siguiente: en las celdas de los animales infectados se observó la formación de grumos debido a la aglutinación del reactivo, mientras que en los animales sanos o vacunados se observara una mezcla heterogénea.

#### **3.4.2 PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO**

El método para comprobar si un conejo se encuentra infectado con *Pasteurella multocida* tipo "A", comprende los pasos de utilizar un reactivo que contiene antígeno de la *Pasteurella multocida* tipo "A" específico de conejo. Los resultados se someten a un método de interpretación cualitativo en donde las celdas de los animales infectados presentarán la formación de aglutinación indicando así un resultado positivo; mientras que, en los animales sanos se observará una mezcla sin aglutinación indicando un resultado negativo.



#### 4.0 RESULTADOS

Se lograron aislar colonias típicas del género *Pasteurella* de las muestras de hígado y pulmón sembradas en placas de agar sangre, provenientes de un conejo aparentemente sano, perteneciente a la granja cunícula de Campo 4 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán ubicada en Cuautitlán Izcalli, Estado de México; dicho conejo presentaba secreción mucoide de ambas cometas nasales.

Cada muestra fue sembrada por triplicado en placas de agar sangre e incubadas a 37°C durante 24 horas, al término de las cuales fueron retiradas de la incubadora bacteriológica, seleccionando entonces, aquellas placas en las que se observó desarrollo bacteriano, en especial aquellas colonias cuyas características morfológicas coincidían con el género *Pasteurella*, a estas colonias se les realizó tinción de Gram observando al microscopio características de tinción y morfología, sembrándolas por la técnica de dilución de colonias en placas de agar sangre, logrando así obtener un cultivo puro, en el cual no se observó hemólisis del medio de agar sangre, el crecimiento reveló colonias mucoides grisáceos, Gram negativas que se identificaron con la pruebas bioquímicas practicadas obteniéndose los siguientes resultados: oxidasa y catalasa positiva, urea, citratos, motilidad y producción de gelatinasa negativas, y obteniéndose un resultado positivo a la producción de indol.

En cuanto a la fermentación de carbohidratos, la cepa presentó los siguientes resultados: glucosa, sucrosa y manitol positivos, mientras que la fermentación de lactosa resultó negativa, señalando así que se trataba de una cepa de la especie *multocida*.

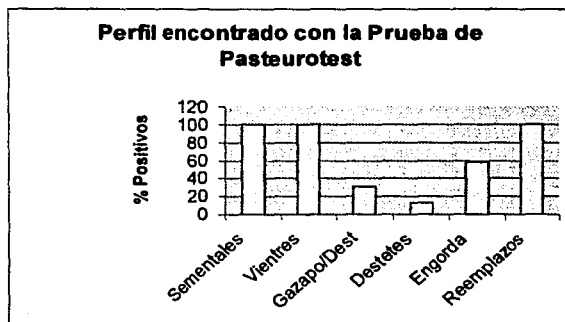
Una vez identificada la bacteria como perteneciente al género *Pasteurella* especie *multocida*, se procedió a identificar el tipo capsular mediante la prueba de descapsulación bacteriana con *Staphylococcus aureus* productor de hialuronidasa, observándose una disminución en el tamaño y rugosidad del crecimiento de las colonias bacterianas típicas del género *Pasteurella* adyacentes a la línea estafilocócica, debido a la difusión de la hialuronidasa estafilocócica en el gel, indicando así un resultado positivo, respaldando esta prueba con un resultado negativo a la prueba rápida de precipitación con acriflavina que identifica el tipo "D".

Se encontró en los 20 conejos de reemplazo, los 20 vientres y los 20 sementales muestreados, sin excepción todos ellos fueron seropositivos a la prueba de aglutinación en placa mientras que, en conejos de engorda, de un total de 27 conejos muestreados, 17 (58.6%) de ellos fueron seropositivos; en los gazapos, de un total de 26 conejos muestreados, 8 (30.77%) fueron seropositivos y finalmente, de los 16 conejos recién destetados muestreados, solamente 2 (12.5%) de ellos fueron seropositivos, estos resultados se encuentran resumidos en el Cuadro 2 y la Gráfica 1.

**Cuadro 2. Porcentaje de positividad obtenido con la prueba de aglutinación en placa "Pasteurotest" MR**

ETAPAS DE DESARROLLO	DE CONEJOS MUESTREADOS	No. DE POSITIVOS PASTEUROTEST	SEROPOSITIVIDAD (%)
SEMENTALES	20	20	100
VIENTRES	20	20	100
GAZAPO Y DESTETE	26	8	30.8
DESTETE	16	2	12.5
ENGORDA	29	17	58.6
REEMPLAZO	20	20	100

**Gráfica 1. Estudio del porcentaje de positivos a la prueba**



## 5.0 DISCUSION

En los conejos, *Pasteurella multocida* tipo "A" se encuentra frecuentemente implicada con enfermedades respiratorias como son rinitis crónica y bronconeumonía aguda. Hasta ahora, se dispone de poca información concerniente a la edad en la cual los conejos jóvenes llegan a infectarse de forma natural con dicha bacteria<sup>(32)</sup> y Beasley, 1989). Estudios preliminares sugieren que los cultivos nasales empleados para el diagnóstico de la Pasteurelosis en conejos, son incapaces de detectar los portadores subclínicos, por lo que resulta necesario emplear métodos serológicos sensibles y específicos que corroboren los resultados obtenidos mediante cultivo nasal.

En uno de los primeros trabajos realizados para evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba de aglutinación en placa "Pasteurotest", Pérez (1993), correlacionó un método serológico para el diagnóstico de la neumonía crónica del cerdo producida por *Pasteurella multocida* tipo "A" con las lesiones pulmonares y el aislamiento bacteriológico del microorganismo, para lo cual, se recolectó 146 pulmones con sus respectivos sueros obtenidos de cerdos de rastro. Los pulmones se clasificaron de acuerdo al tipo de lesión neumónica que presentaron consolidación gris roja (CGR), consolidación fibrino hemorrágica (CFH) y sin cambios patológicos aparentes (SCPA). Se trabajaron todas las muestras de pulmón para el aislamiento de la bacteria tipificando algunas cepas para la preparación del reactivo de *Pasteurella multocida* tipo "A", encontrándose que de los 146 sueros, el 37.8% de ellos fue positivo para *Pasteurella multocida* tipo "A". El análisis estadístico ( $J_i^2$ ) realizado, reveló que los estudios serológicos positivos fueron dependientes del aislamiento de *Pasteurella multocida* encontrándose que el tipo "A"  $J_i=55$  fue muy alto. El comportamiento serológico fue completamente diferente en los casos donde no hubo aislamiento, ya que se observó que en donde el pulmón es no neumónico y serología positiva a *Pasteurella multocida* tipo "A" son sumamente bajos.

Por otro lado, se encontró que un 22% de los casos donde se aisló *Pasteurella multocida* de pulmón normal, la serología fue negativa a *Pasteurella multocida* tipo "A" contemplándose que en estos casos el microorganismo presente o aislado es *Pasteurella multocida* tipo "D", ocurriendo lo mismo en el 26% de los casos donde se aisló *Pasteurella multocida* de pulmón neumónico y serología negativa al tipo "A".

El análisis estadístico reveló una relativa sensibilidad (69.6%), y una alta especificidad (91.0%) para la serología de *Pasteurella multocida* tipo "A" por el método de aglutinación en placa "Pasteurotest".

Al realizar el muestreo en los conejos de la granja cunicula estudiada, se observó en perfil serológico que *Pasteurella multocida* habita endémicamente en la granja muestreada, ya que como podemos apreciar en la Gráfica 1, la incidencia de *Pasteurella multocida* posee un porcentaje elevado de reactores positivos (100%), presentándose una mayor incidencia de reactivos positivos en conejos que han permanecido por un tiempo mayor en la instalación afectada, y como se observa en el perfil serológico, los sementales, vientres están 100% afectados, mientras que se encontró aumentado a un 30.77% en gazapos, pero esto es debido a la inmunidad proporcionada por la madre; en los conejos recién destetados, se encontró en menor porcentaje y fue de un 12.5% de reactores positivos, y un 58.6% en conejos de engorda, posteriormente en aumento de reactores positivos se incrementa en forma drástica hasta un 100% en los conejos de reemplazo. Observándose así mismo, la colonización de los conejos con *Pasteurella multocida* en una granja convencional a tan solo dos semanas de edad, aunque en un pequeño porcentaje (12.5%), al comienzo de la respuesta humoral activa, indicado por el incremento de reactores positivos al antígeno de *Pasteurella multocida* en conejos de más de 8 semanas de edad<sup>(41)</sup>, que dichos anticuerpos eran propios del conejo, indicando que en este periodo de vida ya está presente la infección.

Estos resultados pueden respaldarse si consideramos que la respuesta inmune observada en las diferentes especies sometidas a vacunación es predominantemente de naturaleza humoral, ya que es posible que el mosaico antigénico de *Pasteurella multocida* estimule tanto cualitativa como cuantitativamente diferentes clases de inmunoglobulinas en las diversas especies de huéspedes<sup>(14)</sup>. Esto fue observado en la infección natural con *Pasteurella multocida*, la cual fue seguida por la detección de anticuerpos IgM e IgG, encontrándose que en la mayoría de los conejos estos anticuerpos son detectados de la segunda a la tercera semana después del último cultivo nasal negativo, observándose que la respuesta de anticuerpos de la clase IgM se ve incrementada poco después de la infección, regresando a niveles normales después de unas cuantas semanas, mientras que la respuesta de anticuerpos de las clase IgG continua incrementándose y permanece elevada<sup>(20)</sup>, lo que nos permite detectar anticuerpos específicos para *Pasteurella multocida* en las diferentes etapas de la vida.

En conejos y aves, donde *Pasteurella multocida* es el agente primario que causa la Pasteurelisis pulmonar, existen estudios serológicos para el diagnóstico de esta enfermedad, trabajando métodos serológicos para el diagnóstico de esta enfermedad, trabajando métodos serológicos tales como la prueba del inmunodifusión en gel y la prueba de ELISA en el caso de los conejos, utilizando antígenos solubles de superficie purificados por el aislamiento de la cepa P-1059 de *Pasteurella multocida* observándose la inherente superioridad en cuanto a sensibilidad de la prueba ELISA;

En los casos de las aves, se ha utilizado pruebas de micro aglutinación y ELISA para su diagnóstico<sup>(35,37)</sup>, sin embargo, la prueba de aglutinación en placa "Pasteurotest" realizada para determinar anticuerpos específicos contra *Pasteurella multocida* tipo "A" en conejos, demuestra que; Además de ser altamente específica para el tipo "A" y poseer una buena sensibilidad, ofrece ciertas ventajas sobre los métodos anteriormente citados, ya que, la elaboración del antígeno no requiere de equipo de laboratorio sofisticado ni el uso de reactivos o soluciones costosas o de empleo delicado.

En cuanto al estudio de la dependencia de la infección en relación con la edad y el sexo de los conejos<sup>(46)</sup>, realizaron un estudio para comprobar la prevalencia de *Pasteurella multocida* en los cornetes nasales de 135 conejos, encontrando una mayor prevalencia de infección en machos adultos (38%) que en machos jóvenes (6%), similarmente, la prevalencia de infección en hembras adultas (80%) fue mucho mayor que en hembras jóvenes (10%) dentro de la misma colonia de estudio, en el presente trabajo no se observa una relación entre la incidencia de infección y el sexo de los conejos, ya que de 20 sementales y 20 vientres muestreados al azar, en ambos casos se obtuvo 100% de reactores positivos, lo cual da a suponer que la prevalencia de *Pasteurella multocida* en granjas cunícolas se incrementa con la edad de los conejos y más específicamente, con el tiempo de permanencia de los conejos en granjas afectadas, lo cual indica la existencia de una infección persistente por el contacto continuo con *Pasteurella multocida*, señalando la necesidad de monitorear tanto los conejos recién adquiridos, que serán introducidos en la colonia como a los animales adultos para así lograr la eliminación de dicha bacteria<sup>(41)</sup>. Ya que la presencia de una infección persistente con *Pasteurella multocida* se atribuye a conejos sanos portadores de la enfermedad, estado que es atribuido entre otras causas a lesiones localizadas tratadas con terapia que no responden a antibióticos lo que hace la eliminación de la infección en el conejo afectado virtualmente imposible<sup>(37)</sup>.

Para el control de la enfermedad, y debido al bajo número de conejos infectados con *Pasteurella multocida* a las 4 semanas de edad, la vacunación en este periodo de vida fue sugerida por DiGiacomo y cols. (1983), sin embargo, debido a que hasta ahora no se encuentra disponible una vacuna realmente eficaz la cual ofrezca protección contra esta bacteria altamente antigénica, la mejor forma de controlar la infección es la prevención, por lo que es necesario identificar conejos portadores y/o infectados. La prueba de aglutinación en placa (Pasteurotest) aquí presentada, se considera idónea para detectar directamente anticuerpos específicos contra *Pasteurella multocida* tipo "A" en animales infectados dentro de una granja afectada, además de que también nos permite identificar conejos seronegativos, con lo cual el cunicultor puede aplicar las medidas sanitarias necesarias para erradicar las enfermedades ocasionadas por dicha bacteria.

## 6.0 CONCLUSIONES

- *Pasteurella multocida* es responsable de un gran número de formas clínicas de la enfermedad, de las cuales la gran mayoría culminan con la muerte del huésped, situación que se observó en la granja cunicula de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Campo 4.
- La granja cunicula evaluada presenta brotes endémicos de Pasteurelosis, observándose que el porcentaje de reactores positivos es mayor en conejos adultos (100%) que en conejos de engorda (58.6%), en gazapos (30.77%) o recién destetados (12.5%).
- No se encontró asociación alguna en la incidencia de infección con respecto al sexo de los conejos, sin embargo, si se observa una asociación directa del porcentaje de infección con respecto a la edad de los conejos.
- La infección y la enfermedad en conejos jóvenes se pueden atribuir entre otros factores a: El alto porcentaje de conejos adultos infectados en la colonia, La virulencia de la cepa bacteriana presente y, Las prácticas de manejo, tales como la limpieza, el número de conejos por jaula y la posición de ventilación adecuada en la granja.
- Se logro implantar un método serológico rápido para detectar conejos portadores y/o infectados, ya que los cultivos nasales comúnmente empleados para el diagnóstico de *Pasteurella multocida* en conejos, son incapaces de detectar portadores subclínicos de la enfermedad.
- La sensibilidad es buena para *Pasteurella multocida* tipo "A" y que además, el método serológico es altamente específico.

## 7. REFERENCIAS

1. Alexander, M. M., Sawin, P. B. and Roehm, d.A. "Respiratory Infection in the Rabbit: An enzootic caused by *Pasteurella lepisepitica* and Attempts to Control it by vaccination", J. Infect. Dis., 90, pp: 30-33, 1952.
2. Anderson, L. C.; Rush, H.G. and Glorioso J.C. " Strains Differences in the Susceptibility and resistance of *Pasteurella multocida* to phagocytosis and Killing by Rabbit Polymorphonuclear Neutrophils". Am. J. Vet. Res. 45(6): 1193-1198, 1984.
3. Bashin, J.L. and Laponte-Shaw, L. "Antigenic Analysis of *Pasteurella multocida* (serotype I ) by Crossed Immunoelectrophoresis: Characterization of cytoplasmic and Cell envelope associated antigens". Can. J. Microbiol. 26: 676-689, 1980.
4. Bjotvedt G.; Bertke, E. M. and Hendricks, G.M. "Peritonitis due to *Pasteurella multocida* in Rabbit". Vet. Med. Pp.: 215-216, 1979.
5. Brodgen, K. A. and Rebers, P.A. "Serologic Examination of the Westphal-Type Lipopolysaccharides of *Pasteurella multocida*". Am. J. Vet. Res. 39(10): 1680-1682, 1978.
6. Brodgen, K. A. and Packer, R. A. "Comparison of *Pasteurella multocida* Serotyping Systems". Am. J. Vet. Res. 40 (9): 1332-1335, 1979.
7. Carter, G.R. and Rundell, S.W. "Identification of Type A Strains of *Pasteurella multocida* Using Staphylococcal Hyaluronidase". Vet. Rec., 96, pp: 343, 1975.
8. Carter, G.R. "Genero *Pasteurella* pp.: 348-356. En Merchant, I. A. y Packer, R. A. (eds). " Bacteriologia y Virologia Veterinarias". Tercera edición. Ed: Acribia, Zaragoza, España. 1970.
9. Carter, G.R. and Subronto, P. "Identification of Type D Strains of *Pasteurella multocida* with Acriflavine". Am. J. Vet. Res., 34(2), 1973.
10. Carter, G.R. " The Genus *Pasteurella*", pp.: 1383-1390. En Starr, M. P.; Stolp, H.; Trüper, H. G. ; Shlegel (eds). "The Prokaryotes". A Handbook on Habitans, Isolation and Identification of Bacteria. Vol. II. Springer-Verlay. New York, N.Y., 1987.

11. Carter, G.R., 1991 En Carter, G.R. y Chengappa. (eds). "Essentials of Veterinary, Bacteriology". Cuarta edición , Ed: Lea y Febiger, Londres, Inglaterra.
12. Chengappa, M. M. ; Myers, R.S. and Carter, G.R. Capsular and Somatic Types of *Pasteurella multocida* from Rabbits". Can. J. Comp. Med. 46, pp: 437-439. 1982.
13. Chrisp, C. E. and Foged, N.F. "Induction of Pneumonia in Rabbits by use a Purified Protein Toxin from *Pasteurella multocida*" Am.J. Vet. Res., 52 (1): 56-61, 1991.
14. Collins, F. M.; "Mechanisms of Acquired Resistance to *Pasteurella multocida* Infection: A Review". Cornell. Vet., 67(1): 103-138, 1977.
15. Corbeil, L.B.; Strayer, D. S.; Skaletsky, E.; Wunderlich, A. and Sell, S. "Immunity to *Pasteurellosis* in Compromised Rabbits". Am. J. Vet. Res., 44(5): 845-850, 1983.
16. Deeb, B. J.; DiGiacomo, R. F.; Bernard, B. L. And Silbernagel S. "*Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* Infections in Rabbits". J. Clin. Microbiol., 28(1): 19-25.
17. De Jong, D.; Manning, P.J.; Gunther, R. and Swaason, D.L. "Colonization of Rabbits by *Pasteurella multocida*: Serum IgG Responses Following Intranasal Challenge with Serologically Distinct Isolates". Lab. Anim. Sci., 42(1): 13-18, 1992.
18. De Jong, D.; Manning, P.J, 1994 Bacterial diseases, p. 129-170 In P. J. Manning, D.H. Ringler, and C.E. Newcomer (ed). The Biology of the laboratory rabbit, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York, N.Y.
19. DiGiacomo, R. F.; Allen, V. And Hinton M. H. "Naturally acquired *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* infection in a closed colony of Rabbits: Characteristics of isolates". Lab. Anim. 25(3): 236-241, 1991.
20. DiGiacomo, R. F.; Taylor, F. G. R.; Allen, V. And Hinton, M. H. "Naturally Acquired *Pasteurella multocida* Infection in Rabbits: Immunological Aspects". Lab. Anim. Sci. 40(3): 691-697, 1990.
21. DiGiacomo, R. F.; Garlighthouse, L.E. Jr. And Van Hosier, G.L. Natural History of Infection with *Pasteurella multocida* in Rabbits". J. A. V. M. A. 138(11): 1172-1175, 1983.



22. DiGiacomo, R. F.; Jones, C D. R. and Wathes, Ch. M. "Transmission of *Pasteurella multocida* in Rabbits". Lab. Anim. Sci. 37(5): 621 - 623, 1987.
23. DiGiacomo, R.F.; Deeb, B.J.; Giddens, W.E. et al. "Atrophic Rhinitis in New Zealand White Rabbits Infected with *Pasteurella multocida*". Am. J. Vet. Res., 50. pp: 1460-1465, 1989.
24. Esslinger, J.; Hermann, G. and Blobel, H. "Adhesion of *Pasteurella multocida* to HeLa cells and to Macrophages of different animal species". Revue. Med. Vet. 145(1): 49-53, 1994.
25. Flatt, R.E. "Pyometra and Uterine Adenocarcinoma in Rabbit", Lab. Anim. Care, 19, pp: 398-401, 1969
26. Flatt, R.E. and Dungrowth, D: L. "Enzootic Pneumonia in Rabbits: Naturally Occurring lesions in lungs of Apparently Healthy Young Rabbits", Am. J. Vet. Res., 32, pp: 621- 626, 1971.
27. Flatt, R.E. "bacterial Diseases". Pp.. 194-205. En : Weiabroth, S.h.; Flat, R.E.; Kraus, A. L. (eds). "The biology of the Laboratory Rabbit". New York, N.Y., Academic Press Inc., 1974.
28. Ferry, N. S. "Bacteriology and Control on Contagious Nasal Catarrh (Snuffles) of Rabbits", J. Lab. Clin. Med., 5, pp: 311-318, 1920. Ostlers, D.C. "The Diseases of Broiler Rabbits". Vet. Rec., 73, pp: 1237-1252, 1961.
29. Foged, N.T. "Quantitation and Purification of the *Pasteurella multocida* Toxin by Using Monoclonal Antibodies". Infect. And Immun. 56(8): 1901-1906, 1988.
30. Fox, R.R., Norberg, R.F. and Myers , D. D. "The Relationship of *Pasteurella multocida* to Otitis Media In the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)", Lab. Anim. Care., 21, pp: 45-48, 1971.
31. Frymus, T.; Bielecki, W. and Jacubowski T. "Toxigenic *Pasteurella multocida* in Rabbits with Naturally Occurring Atrophic Rhinitis". J. Vet. Med. 38:265-268, 1991.
32. Glass, L. S. and Beasley, J. N. "Infection With and Antibody Response to *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in Immature Rabbits". Lab. Anim. Sci. 39(5): 406-410, 1989.

33. Glorioso, J. C.; Jones, G. W.; Rush, H. G.; Pentler, L. J.; Darif, C. A. And Coward, J. E. "Adhesion of Type A *Pasteurella multocida* to Rabbit Pharyngeal Cells and its Possible Role in Rabbit Respiratory Tract Infections". *Infect. Immun.*, 35(3): 1103-1109, 1982.
34. Hagen, K. W. Jr. A. B. "Enzootic *Pasteurellosis* in Domestic Rabbits. I. Pathology and Bacteriology". *J. A. V. M. A.* Pp:77-80, 1958.
35. Heddleston, K. L. and Rebers, P. A. "Properties of Free Endotoxin from *Pasteurella multocida*". *Am. J. Vet. Res.* 36(4): 573-574, 1975.
36. Hofing, G. L.; Rush, H. G.; Petrus, A. R. and Glorioso J. C. "In Vitro Killing of *Pasteurella multocida*: The Effect of Rabbit Granulocyte and Specific Antibody Source". *Am. J. Vet. Res.* 40(5): 679-683, 1979.
37. Holmes, T. H.; Matsumoto, M.; Patton, N. M. And Zehfus, B. R. "Serologic Methods for Detection of *Pasteurella multocida* Infections in Nasal Culture Negative Rabbits". *Lab. Anim. Sci.* 36(6): 640-645, 1986.
38. Huebner, R. A. "*Pasteurella pyometra* in a rabbit". *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 93, pp: 389, 1938.
39. Jaslow, B. W.; Ringler, D. H.; Rush, H. G. and Glorioso, J. "*Pasteurella* Associated Rhinitis of Rabbits: Efficacy of Penicillin Therapy". *Lab. Anim. Sci.* 31(4): 382-385, 1981.
40. Klaassen, J. M.; Bernard B. L.; DiGiacomo, R. F.; "Enzymelinked immunosorbent assay for immunoglobulin G antibody to *Pasteurella multocida* in rabbits". *J. Clin. Microbiol.*, 21:617-621, 1985.
41. Kawamoto, Eiichi; Sawada, Takuo and Maruyama, Tsutomu. "Prevalence and Characterization of *Pasteurella multocida* in Rabbits and Their Environment in Japan". *Jpn. J. Vet. Sci.* 52(5): 915-921, 1990.
42. Kawamoto, E.; Sawada T.; Sato, T.; Suzuki, K.; and Maruyama, T. "Comparison of indirect haemagglutination test, gel-diffusion precipitin test, and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Pasteurella multocida* in naturally and experimentally infected rabbits". *Lab. Anim.* 28(1): 19-25.
43. Kyaw, M. H. "Note on a Bacterial Cause of Sterility in Rabbits". *Vet. Rec.*, 57, pp: 502-503, 1945.

44. Lesbouryes, G. "Pathologie du Lapin". Librairie Maloine, Société Anonyme d'Éditions Médicales et Scientifiques, Paris., 1963.
45. Lu, Y. S.; Ringler, D.H. and Park, J. S. "Characterization of *Pasteurella multocida* Isolates from The Nares of Healthy Rabbits and Rabbits With Pneumonia". Lab. Anim. Sci. 28(6): 691-697, 1978.
46. Lu, Y. S.; Lai, W. C.; Pakes, S. P. and Vie, L. C. "A Monoclonal Antibody against a *Pasteurella multocida* Outer Membrane protein Protects Rabbits and Mice against Pasteurellosis". Infect. Immun., 59(1): 172-180, 1991.
47. Lukas, V. S.; Ringler, D. H.; Chrisp, C. E. and Rush, H. G. "An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Serum IgG to *Pasteurella multocida* in Naturally and Experimentally Infected Rabbits". Lab. Anim. Sci. 37(1): 60-64, 1987.
48. Maheswaran, S. K. and Thies, E. S. "Influence of Encapsulation on Phagocytosis of *Pasteurella multocida* by Bovine Neutrophils". Infect. And Immun. 26(1): 76-81, 1979.
49. Manheim, W. "Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods". In Krieg, N. R. and Holt J. G.(ed). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 1, 9<sup>th</sup> ed. Ed. William and Wilkins Co., Baltimore.
50. Manning, P. J. "Serology of *Pasteurella multocida* in Laboratory Rabbits: A Review". Lab. Anim. Sci. 32(6): 666-671, 1982.
51. Manning, J. P. "Naturally Occurring Pasteurellosis in Laboratory Rabbits: Chemical and Serological Studies of Whole Cells and Lipopolysaccharides of *Pasteurella multocida*". Infect. And Immun. 44(2): 502-507, 1984.
52. Manning, P. J.; Brackee, G.; Naasz, M. A.; DeJong, D. and Leary, S. L. "A Dot-Immunobinding Assay for the Serodiagnosis of *Pasteurella multocida* Infection in Laboratory Rabbits". Lab. Anim. Sci. 37(5): 615-620, 1987.
53. McCartney, J. E. and Olitsky, P. K. "Studies on the Etiology of Snuffles in Stock Rabbits. Paranasal Sinusitis a Factor in the Interpretation of Experimental Results". J. Exp. Med. 38, pp:591-604, 1923.
54. Martinez, Castillo Miguel Angel. "Cunicultura". Facultad de Medicina Veterinaria. UNAM. Pp:147.

55. Namioka, S. and Murata, M. "Serological Studies on *Pasteurella multocida*. II Characteristics of Somatic (O) Antigen of the Organism". Cornell. Vet. P:507-521, 1961.
56. Percy, D. H.; Bhasin, J. L. and Rosendal, S. "Experimental Pneumonia in Rabbits Inoculated with Strains of *Pasteurella multocida*". Can. J. vet. P:507-521, 1961.
57. Pérez, G. E. (1993) "Una prueba Serológica para el Diagnóstico de la Neumonía. Crónica del Cerdo Producida por *Pastereulla multocida* tipo "A". Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. P.p 39-43.
58. Peterson, R. R.; Deeb, B. J. and DiGiacomo, R. F. "Detection of Antibodies to *Pasteurella multocida* by Capture Enzyme immunoassay using a Monoclonal Antibody Against P37 Antigen". J. Clin. Microbiol., 35(1): 208-212, 1997.
59. Ramdani and Adler B. "Opsonic monoclonal Antibodies Against Lipopolysaccharide (LPS) in immunity". Vet. Microbiol. 26(3): 335-347., 1991.
60. Rebers, P. A; Heddleston, K. L. Rhoades K. R. "Isolation from *Pasteurella multocida* of a Lipopolysaccharide Antigen with Immunizing and Toxic Properties". J. of Bacteriol., 93(1)7-14, 1967.
61. Rimler, B. R. and Brodgen, K. A. "*Pastereulla multocida* Isolated from Rabbits and Swine: Serologic Types and Toxin Production". A.J. Vet. Res. 47 ( 4 ): 730-737. 1986.
62. Ringler, D. H. ; Peter, G. K.; Chrisp, C. E. and Keren, D. F. "Protection of Rabbits against Experimental Pastereullosis by Vaccination with a Potassium Thiocyanate Extrac of *Pastereulla multocida*". Infec and Immun. 49(3): 498-504. 1985
63. Rush, H. G., Glorioso J. C. Da Rif, C. A., (1981) "Resistance of *Pastereulla multocida* to Rabbit neutrofil Phagocytes and killing" Am. J. Vet. Res. 42 (10): 1760-1768
64. Scharf, R. A.; Montelone, S. A. and Stark, D.M. "A Modified Barrier System for Manteinance of *Pastereulla* free Rabbits" Lab. Anim. Sci. 513-515. 1981.

65. Sheppard, H. W.; Redelma, D. and Sell, S. "In vitro Studies of the Rabbit Immune System". IV. Differential Mitogen Responses of Isolated T and B Cells. *Cell. Immunol.* 24(1):34-44, 1976.
66. Sigmund, O.H. "Pasteurellosis". In: Siegmund, O. H. "THE Merck Veterinary Manual" 2<sup>nd</sup>. Ed., p:1375. Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey 1961.
67. Skaletsky, E.; Corbeil, L. B.; Wunderlin, A.; Sell S. and Strayer, D. S. "Proliferative Responses of Rabbit Lymphocytes to *Pasteurella multocida* Decrease with Prolonged Immunization". 38 (1) 383-385, 1982.
68. Straus, D. C.; Jolley, W. L. and Pordy, C. W. "Characterization of Neuraminidases Produced by Various Serotypes of *Pasteurella multocida*". *Infect. Immun.* 64(4): 1446-1450., 1996.
69. Suckow, M. A.; Bowersock, T. L.; Nielsen, K. and Grigdesby, C. F. "Enhancement of respiratory immunity to *Pasteurella multocida* by cholera toxin in rabbits". *Lab. Anim.* 30(1): 120-126.
70. Suckow, M. A.; Martin, B. J.; Bowersock, T. L. and Douglas, F. A. "Derivation of *Pasteurella multocida* free rabbit litters by enrofloxacin treatment". *Vet. Microbiol.* 51(1): 161-168.
71. Targowski, S. and Targowski, H. "CO<sub>2</sub> Requirement for Growth of *Pasteurella* Strain Isolated from Rabbits". J. E., Clements M.E y Guptaz. Z.N. (1978). "Isolation of *P. aerogenes* from the uterus of a rabbit following abortion". *Lab. Anim. Sci.* 28 (4):444-447.
72. Thurson, J. R.; Rimel, R. B.; Ackermann, M. R. and Cheville, N. F. "Use of rats to compare Atrophic Rhinitis Vaccines for Protection Against Effects of Heat-labile Protein Toxin Produced by *Pasteurella multocida* serogroup D". *Vet. Immun. and Immunopat.* 33: 155-162, 1992.
73. Tizard, Ian. "Inmunologia Veterinaria". Capítulo 22. 4a Ed. Interamericana, México, D. F.
74. Trigo, E. and Pijoan, C. "Presence of Pili in *Pasteurella multocida* Strains Associated with Atrophic Rhinitis". *Vet. Rec.*, 122(1)19, 1998.
75. Venna, M. M.; Blanchard, B.; Thomas, D. and Kobisch, M. "Adherence of *Pasteurella multocida* Isolated from Pigs and Relationship with Capsular Type and Dermonecrotic Toxin Production" *Ann. Rech. Vet.* 22:211-218, 1991.

76. Webster, L. T. "The Epidemiology of a Rabbit Respiratory Infection. I. Introduction", J. Exp. Med., pp: 837-841, 1924.
77. Webster, L. T. "Epidemiological Studies on Respiratory Infections of the Rabbit VII. Pneumonia Associated with Bacterium lepiSepticum". J. Exp. Med., 43, p.p 555-572. 1925
78. Weisbroth, S. H. and Scher, S. "The Establishment of specific- pathogen-free Rabbit Breeding Colony. II. Monitoring for Disease and Health Statistics", Lab. Anim. Care, 19, p.p: 795-799. 1969.
79. White, D. J.; Jolley, W. L.; Purdy, C. W. and Straus, D. C. "Extra cellular Neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A:3 Strain Associated with Bovine Pneumonia". Infect. and Immun. 63(5): 1703-1709., 1995.
80. Woolcock, J. B. and Collins, F.M. "Immune Mechanism in *Pasteurella multocida* Infected Mice". Infect. And Immunity. 13(3)949-958, 1976
81. Zimmerman, T. E.; Deeb, B. J. and DiGiacomo, R. F. "Polypeptides associated with *Pasteurella multocida* infection in rabbits". Am. J. Vet. Res. 53(7): 1108-1112., 1992.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN