

11680



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE  
PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *Mannheimia*  
*haemolytica* A2 PRODUCTORES DE NEUMONÍAS  
EN OVINOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS  
(MICROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A :

JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. FRANCISCO JOSÉ TRIGO TAVERA.

ASESORES:  
DRA. MIREYA G. DE LA GARZA AMAYA.  
DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *Mannheimia haemolytica* A2 PRODUCTORES DE NEUMONÍAS EN OVINOS. Tesis Doctoral. **José Francisco Morales Alvarez**

**COMITÉ TUTORAL Y JURADO:**

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES.....	Presidente.
DRA. MIREYA DE LA GARZA AMAYA.....	Primer vocal.
DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA.....	Segundo Vocal.
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO.....	Tercer vocal.
DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ.....	Secretario.
DR. VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIERREZ.....	Primer Suplente.
DR. FRANCISCO JOSÉ TRIGO TAVERA.....	Segundo Suplente

*Todo mi ser es hacer y todo mi hacer es  
mi ser. El ser es algo que es y no  
puede dejar de ser, al cual no se le  
debe quitar el sentido de lo propio. Es  
autónomo, autosuficiente y autócrata;  
no hay que tratar de convencerlo, sino  
de persuadirlo. Es un todo complejo,  
que si se divide, deja de ser lo que es.  
Nunca llega a ser maduro por su  
constante devenir. Para Él nada es  
importante y todo vale la pena.*

*Autor anónimo*

*2004.*

## **DEDICATORIA:**

Para **AIME ISABEL SÁNCHEZ PEREZ, AIMEE MARISOL MORALES SÁNCHEZ Y ANA DANIELA MORALES SÁNCHEZ** con profundo amor, por su apoyo y entereza para soportar y afrontar todas las adversidades suscitadas durante el desarrollo de este trabajo y por que son mi esposa e hijas y son lo que más quiero en esta vida.

A mi madre **CARMEN ALVAREZ DE MORALES** a quien le debo mi existencia y quien ha sabido ser lo que difícilmente se puede ser, padre y madre a la vez.

A mi padre **FRANCISCO MORALES MUÑOZ q.e.p.d.**

A mis hermanos: **MARTHA, OSCAR, ROSA, JUAN, BERTHA, LETICIA Y VÍCTOR** porque son sinónimo de unión, fortaleza y apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

A **Olga Lidia Martínez Martínez** por todo tu apoyo y por todo lo que representaste en el desarrollo de este trabajo.

A **Francisco J. Trigo Tavera, Mireya de la Garza y Jorge Tórtora**, porque más que mis guías los considero mis amigos.

Al honorable jurado que me examinó, Doctores todos ellos, **Susana Mendoza Elvira, Francisco Suárez Gúemes, Abel Ciprián Carrasco y Víctor Tenorio Gutiérrez** por el tiempo dedicado y sus sugerencias atinadas.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Bacteriología del CENID-Microbiología: **En especial a Arturo, Efrén, Bety, Francisco Aguilar, Laura Jaramillo, Ernestina, Sara, Guadalupe de la Rosa.**

A **Virginia Ochoa y Marisela Leal** por su amistad y gratos momentos.

Al departamento de Patología de la FES-C. Especialmente a **Juan Carlos del Río y Ana María.**

A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**, porque ahí he llevado a cabo toda mi formación profesional.

Al **CENID-Microbiología, INIFAP**. Porque ha sido mi segunda casa y me ha apoyado para realizar mis estudios de posgrado.

Al **CONACyT y a la DGEP-UNAM** por el apoyo financiero del proyecto y la beca otorgada.

A mis tesisas, amigos y colaboradores: Especialmente a **Lupita, América, Jehieli, Renata, Armando, Aidé, Angel, Juan.**

A **Dios.**

.....y a todos aquellos que de alguna forma contribuyeron en la realización de esta tesis

## CONTENIDO

<b>Summary</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	2
<b>I.- Introducción</b> .....	4
<b>II Objetivo General</b> .....	11
2.- Objetivos particulares.....	11
<b>III Materiales y Métodos</b> .....	12
3.1 Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> a partir de cuadros neumónicos y de microbiota normal en corderos.....	12
3.2 Caracterización de los aislamientos de <i>M. haemolytica</i> .....	12
3.3 Capacidad de producción de leucotoxina de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> A2 de origen diferente.....	13
3.3.1 Ensayo visual simple para la determinación de leucotoxina de <i>M. haemolytica</i> .....	14
3.3.1.1 Obtención de leucocitos de sangre periférica.....	14
3.3.2 (ELISA-indirecto) para medir la cantidad de leucotoxina producida en sobrenadantes de cultivo de <i>M. haemolytica</i> .....	14
3.3.2.1 Purificación del antígeno (leucotoxina) para el ELISA-indirecto.....	14
3.3.2.2. Producción del anticuerpo anti-leucotoxina de <i>M. haemolytica</i> para el ELISA-indirecto.....	15
3.3.2.3 ELISA-indirecto para determinar la capacidad de producción de leucotoxina por las diferentes cepas.....	16
3.4 Producción de proteasas de secreción de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> de diferente origen.....	16
3.4.1. Dependencia de las proteasas de secreción de <i>M. haemolytica</i> a iones divalentes.....	17
3.4.2. Estabilidad en la producción de proteasas de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> .....	17
3.5 Adhesión a células del epitelio traqueal y a macrófagos alveolares de los diferentes aislamientos de <i>M. haemolytica</i> .....	17

3.6 Análisis de los patrones de corte con endonucleasas de restricción de los diferentes aislamientos de <i>M. haemolytica</i> .....	18
3.6.1 Extracción de ADN cromosómico.....	18
3.6.2 Ensayo de corte con endonucleasas de restricción y análisis de los perfiles de corte.....	19
3.7 Infección experimental con <i>M. haemolytica</i> A2 aislada de diferentes cuadros neumónicos y de microbiota normal.....	19
3.7.1 Animales.....	19
3.7.2. Suspensiones bacterianas.....	20
3.7.3. Evaluación de lesiones.....	20
3.8 Detección de la leucotoxina de <i>M. haemolytica</i> A2 en el pulmón de corderos inoculados experimentalmente.....	21
3.8.1 Muestras.....	21
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>25</b>
4.1 Aislamiento de <i>M. haemolytica</i> a partir de cuadros neumónicos y de microbiota normal en corderos.....	25
4.2.- Capacidad de producción de leucotoxina de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> A2 de origen diferente.....	25
4.3.- Adherencia a macrófagos y células del epitelio traqueal de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> A2 de origen diferente.....	27
4.4 Producción de proteasas de secreción de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> de diferente origen.....	28
4.5 Análisis de los patrones de corte con endonucleasas de restricción de los diferentes aislamientos de <i>M. haemolytica</i> .....	28
4.6 Infección experimental con <i>M. haemolytica</i> A2 aislada de diferentes cuadros neumónicos y de microbiota normal.....	29
4.7 Detección de la leucotoxina de <i>M. haemolytica</i> A2 en el pulmón de corderos inoculados experimentalmente.....	30
<b>V.-Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>VI.-Conclusiones.....</b>	<b>61</b>
<b>VII.-Literatura Citada.....</b>	<b>62</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>70</b>



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de trabajo para la evaluación de mecanismos de patogenicidad de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> A2 productoras de neumonías en ovinos.....	22
Figura 2. Capacidad de producción de leucotoxina de aislamientos de diferente origen de <i>M. haemolytica</i> en corderos, mediante la prueba de Ensayo Visual Simple. ....	32
Figura 3. Evidencia de la presencia de leucotoxina en sobrenadantes de cultivo obtenida a diferentes tiempos de incubación de <i>M. haemolytica</i> .....	33
Figura 4. Evidencia de la presencia de leucotoxina en sobrenadantes de cultivo de <i>M. haemolytica</i> (Nitrato de plata).....	33
Figura 5. SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivo de <i>M. haemolytica</i> donde se muestran concentraciones diferentes de proteínas en geles.....	34
Figura 6. Sobrenadante de cultivo de <i>M. haemolytica</i> , fase de crecimiento logarítmico en RPMI-1640 adicionado con 3 % de ASB.....	34
Figura 7. Inmunotransferencia con suero hiperinmune de conejo contra la leucotoxina de <i>M. haemolytica</i> .....	35
Figura 8. Capacidad de producción de leucotoxina de <i>M. haemolytica</i> A2 de diferente origen. ELISA- indirecto.....	36
Figura 9. Lavado bronquioalveolar para la obtención de macrófagos alveolares de corderos para la evaluación de adherencia de <i>M. haemolytica</i> A2.....	37
Figura 10. Células obtenidas del lavado bronquial y del raspado traqueal de corderos.....	38
Figura 11. Adherencia de <i>M. haemolytica</i> a células del epitelio traqueal de corderos.....	38
Figura 12. Adherencia de <i>M. haemolytica</i> a macrófagos alveolares.....	38
Figura 13. Adherencia de <i>M. haemolytica</i> A2 de diferente origen a células del epitelio traqueal (gráfica).....	39
Figura 14. Adherencia de <i>M. haemolytica</i> A2 de diferente origen a macrófagos alveolares de corderos (gráfica).....	39

Figura 15. Actividad de proteasa en sobrenadantes de cultivo de <i>M. haemolytica</i> A2 de diferente origen.....	40
Figura 16. Actividad de proteasa en sobrenadantes de cultivo de <i>M. haemolytica</i> A2 después de varios pases <i>in vitro</i> de la bacteria.....	41
Figura 17. Actividad de proteasa en sobrenadantes de cultivo de <i>M. haemolytica</i> A2 en presencia y ausencia de calcio.....	41
Figura 18. Patrón de corte de la enzima <i>EcoR</i> V de aislamientos de origen diferente de <i>M. haemolytica</i> de corderos.....	42
Figura 19. Patrón de corte de la enzima <i>BamH</i> I de aislamientos de origen diferente de <i>M. haemolytica</i> de corderos.....	43
Figura 20. Temperatura rectal en corderos desafiados con aislamientos de <i>M. haemolytica</i> A2 de diferente origen.....	44
Figura 21. Lesiones en pulmón inducidas por la inoculación de <i>M. haemolytica</i> de diferente origen en corderos.....	45
Figura 22. Lesiones histológicas en pulmón inducidas por la inoculación de <i>M. haemolytica</i> de diferente origen en corderos.....	46
Figura 23. Detección por inmunohistoquímica de la leucotoxina en pulmones de ovinos inoculados con <i>M. haemolytica</i> de diferente origen en corderos.....	47

#### LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Modelo establecido para la evaluación de la adherencia de <i>M. haemolytica</i> de origen diferente a células del sistema respiratorio de corderos.....	23
Cuadro 2. Protocolo de desafío con <i>M. haemolytica</i> A2 de diferente origen.....	24
Cuadro 3. Aislamiento y tipificación de <i>M. haemolytica</i> en ovinos.....	31
Cuadro 4. Actividad de proteasas en sobrenadantes de cultivo de <i>M. haemolytica</i> A2 de diferente origen.....	31

## EVALUATION OF PATHOGENICITY MECHANISMS OF *Mannheimia haemolytica* ISOLATES FROM NASAL CAVITY AND PNEUMONIC LUNGS IN LAMBS.

### Summary

The aim of this work was to determine pathogenic factors differences in *Mannheimia haemolytica* A2 isolates from pneumonic lungs and nasal cavity of clinical healthy lambs. We obtained 45 isolates from nasal cavity which we called microbiote isolates, and 25 from pneumonic lungs which we called pneumonic isolates. The A2 was the most common serotype isolated with 80% and 70% respectively. A comparative analysis between pneumonic and microbiote isolates was done. The evaluations were leukotoxin production ability, secretion of proteases, adhesion to epithelial tracheal and alveolar macrophages cells. We also evaluate the restriction fragments length polymorphism profiles, the capacity to produce lung damage and the presence of leukotoxin in lung tissue. The results showed important differences in the parameters evaluated. It was evident the highest capacity to produce leukotoxin by pneumonic isolates. The pathogenicity of pneumonic isolates was higher than microbiote, due to acute death of two lambs and severe lung lesions in other two lambs after intratracheal inoculation. We also demonstrated the leukotoxin in pneumonic tissue by immunohistochemical method. The leukotoxin was most evident in the lymphoid tissue associated to bronchi and intracellular localization. The 55% microbiote isolates produced secretion proteases in comparison with the 88% of pneumonic isolates. The restriction fragments length polymorphism profiles digested with *EcoR V* endonuclease showed an additional band of 2100 pb size in pneumonic isolates. The *BamH I* digestion showed an additional band of 800 pb in the same isolates. These results could indicate genetic changes which cause different phenotypic characteristics and most of the pathogenic capacity between isolates.

# **EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *Mannheimia haemolytica* PRODUCTORES DE NEUMONÍAS EN OVINOS<sup>a</sup>.**

## **RESUMEN.**

El propósito de este estudio fue determinar posibles diferencias en algunos factores de patogenicidad de cepas de *Mannheimia haemolytica* A2, aisladas de corderos con cuadros neumónicos y de animales clínicamente sanos. Se estudiaron 45 aislamientos de cavidad nasal, los cuales se tomaron como microbiota normal y 25 de pulmones de animales muertos por neumonía; de éstos, el 80 % y 70 % respectivamente, correspondían al serotipo A2. Se compararon dos grupos de aislamientos denominados microbiota y neumónicos, con base en su capacidad de producción de leucotoxina, producción de proteasas de secreción, capacidad de adherencia a células del epitelio traqueal y a macrófagos alveolares, perfiles de corte con endonucleasas de restricción, así como la capacidad de reproducir el cuadro neumónico mediante la inoculación experimental en corderos susceptibles. Los resultados mostraron diferencias claras en casi todos los parámetros evaluados, destacando la mayor capacidad de producción de leucotoxina para los aislamientos de origen neumónico y también en este grupo, se determinó su mayor capacidad de reproducir el cuadro neumónico, en corderos se provocó muerte sobreaguda en dos animales y lesiones evidentes en el pulmón de otros dos. Los ensayos de adherencia mostraron una mayor capacidad adherente para los aislamientos de tipo neumónico a las células del epitelio traqueal, no así en macrófagos alveolares, donde en general los índices de adherencia fueron menores para todas las cepas. También fue posible determinar por inmunohistoquímica, la presencia de la leucotoxina en el tejido pulmonar, lo que implica su participación en la patogénesis de la enfermedad. Su detección fue más evidente en el tejido linfoide asociado a bronquios y de localización intracelular. Se observó que el 55% de los aislamientos de origen microbiota fueron capaces de producir proteasas de secreción, comparado con el 88% de los de origen neumónico. Las diferencias en el patrón de corte con endonucleasas de restricción

---

<sup>a</sup> Tesis doctoral financiada por:  
CONACyT: Proyectos 3903P-B9607 y G38590 B.  
CENID-Microbiología, INIFAP.  
FES-Cuautitlán: Cátedra de investigación 5.15

fueron claras en ambos grupos; al realizar la digestión con la enzima *EcoR V*, se observó una banda adicional por debajo de los 2322 pb para los aislamientos de pulmón, en tanto, al corte con *BamH I* la diferencia se observó por encima de los 564 pb. Estos resultados podrían indicar diferencias genotípicas que reflejan los cambios fenotípicos encontrados y que pueden asociarse con la mayor o menor capacidad patogénica.

## I.- INTRODUCCIÓN

El efecto de las neumonías en animales domésticos es de suma importancia, ya que afecta directamente al proceso productivo de las explotaciones comerciales. La causa de ésta enfermedad, es multifactorial e involucra una combinación de factores predisponentes de tipo estresante, agentes infecciosos virales y bacterianos. Por esta razón se le ha denominado complejo respiratorio de rumiantes. *Mannheimia haemolytica* es el principal patógeno bacteriano en las enfermedades respiratorias en rumiantes.<sup>1</sup>

La primera información del problema apareció en 1921, donde se aisló el germen del pulmón de rumiantes, y en 1932 se propuso el nombre de *Pasteurella haemolytica*.<sup>2,3</sup> De *P. haemolytica* se reconocieron, por hemaglutinación indirecta, 17 serotipos de acuerdo a sus antígenos capsulares solubles.<sup>4</sup> Estos antígenos son básicamente polisacáridos con capacidad antigénica alta.<sup>5</sup> Se identificaron también dos biotipos de acuerdo a diferencias en la fermentación de azúcares.<sup>4</sup> Los serotipos 1, 2, 5-9, 11-14, 16 y 17 correspondían al biotipo A que fermentaban la arabinosa y estaban asociados con neumonía. Los serotipos 3, 4, 10 y 15, pertenecían al biotipo T, que fermentaban trehalosa y causaban cuadros de septicemia.<sup>6</sup>

En 1999, las cepas de *P. haemolytica* del biotipo A fueron reclasificadas en un nuevo género denominado *Mannheimia*. Este género contiene ahora cinco especies, *Mannheimia haemolytica*, donde se encuentran la mayoría de las cepas de referencia del biotipo A, todas arabinosa positivas; *M. glucosida* que incluye al serotipo A11; *M. granulomatis*, aislada de ganado bovino y lepóridos; *M. ruminalis*, que contiene cepas no hemolíticas aisladas del rumen de ganado bovino y ovino, así como *M. varigena*, aislada de bovinos y porcinos.<sup>7,17</sup>

La patogénesis de la Pasteurelosis neumónica es poco clara, los mecanismos que permiten a la bacteria establecerse y diseminarse durante una infección no están completamente estudiados. *M. haemolytica* produce en fase logarítmica de crecimiento una sustancia soluble que es tóxica para macrófagos y leucocitos de rumiantes.<sup>8,9,10,11</sup> Además, varios componentes asociados a la pared celular como el lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME), material capsular, así como otros factores de virulencia involucrados en la colonización, pueden contribuir a la presentación de la enfermedad.<sup>3,12</sup>

La neumonía causada por *M. haemolytica* se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa severa. Sin embargo, se logra aislar este agente de cuadros neumónicos que varían en cuanto a su severidad, distribución y morfolopatología. En estos cuadros se pueden encontrar desde neumonías supurativas focales y difusas, hasta cuadros donde existen lesiones vasculares con trombosis y hemorragias, en los que adicionalmente se puede observar la transformación de macrófagos con aspecto arremolinado o de "avena". Se cree que este último cambio se debe al efecto tóxico de la leucotoxina que produce *M. haemolytica*.<sup>13</sup> Los cuadros neumónicos descritos, ocasionan desde retrasos en el crecimiento hasta la muerte del individuo. Es importante mencionar que *M. haemolytica* forma parte de la microbiota normal de vías respiratorias altas y por lo tanto puede aislarse de individuos clínicamente sanos.

Se menciona que algunos factores predisponentes desempeñan una función determinante en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo: las condiciones medio ambientales adversas y la mala alimentación pueden favorecer la presentación del complejo respiratorio.<sup>1,14</sup>

Se ha demostrado la participación de agentes primarios de tipo viral capaces de iniciar el complejo neumónico (adenovirus, virus respiratorio sincicial y parainfluenza 3, entre otros), sin embargo, el mecanismo de cómo actúan aún no se define satisfactoriamente.<sup>15,16</sup>

También existe la posibilidad de diferencias en cuanto a factores de patogenicidad entre las cepas aisladas de diversos cuadros neumónicos, así como de cepas provenientes de animales sanos. Entre estos factores se pueden mencionar: la capacidad de producir leucotoxina, la presencia de adhesinas, la expresión de PME, de proteínas reguladas por hierro (PRH), plásmidos de resistencia a quimioterapéuticos, antígenos aglutinantes serotipo-específico, neuraminidasa y la sialoglicoproteasa. Estos factores estarían involucrados principalmente en la colonización, replicación del agente y la presentación del cuadro neumónico<sup>17</sup>.

El determinar diferencias entre aislamientos, en cuanto a estos mecanismos de patogenicidad, sería importante porque, por un lado se explicaría parte de la patogénesis de la enfermedad, que como ya se mencionó es poco clara y por otro lado, permitiría elegir cepas con ciertas características para la elaboración de inmunógenos eficaces para

la prevención de la neumonía causada por esta bacteria. Además, se podrían tener pruebas clínicas distintivas de las cepas de microbiota y de las patógenas.

En la actualidad se ha desarrollado una diversidad de inmunógenos para prevenir la neumonía por *M. haemolytica*, con resultados aparentemente satisfactorios en algunos casos,<sup>18,19,20</sup> aunque ninguno de ellos evita completamente el cuadro. Los inmunógenos a base de bacterias vivas de cultivos de 6 horas, utilizados por vía subcutánea, son los que han dado resultados más satisfactorios. Se argumenta que estos biológicos son eficaces porque los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico como: material capsular, leucotoxina y otros carbohidratos no bien definidos. También la replicación del agente en el sitio de inoculación favorece la estimulación de los mecanismos inmunológicos mediados por células.<sup>18</sup>

El uso de bacterinas se va desechando día con día, pues no han tenido efecto en la prevención del problema. Evidencias clínicas han demostrado que animales que recibieron bacterinas han desarrollado incluso una neumonía más severa al desafío, comparados con los animales que no las recibieron.<sup>19,20,21</sup> A pesar de lo anterior, en México se siguen utilizando las bacterinas, sin conocer su efectividad real, los serotipos utilizados y las características de las cepas contenidas.

La eficacia de la vacunación requiere que la respuesta inmune esté encaminada a bloquear los factores o antígenos relacionados con la patogenicidad de la bacteria. Además, es de utilidad examinar el estado inmune de los animales a nivel campo. En la patogénesis de la enfermedad existen múltiples interacciones hospedador-bacteria, que se inician con la inhalación del agente, la colonización nasofaríngea, la llegada al alvéolo, la respuesta a la colonización y culminan con la evasión bacteriana a las defensas del hospedador. En estudios sobre la interacción *M. haemolytica*-hospedador, se han logrado entender y resolver algunas preguntas sobre las fases tempranas de la patogénesis de la Pasteurelisis neumónica. Los eventos en nasofaringe que permiten la proliferación de *M. haemolytica* son desconocidos. Estudios recientes sugieren que el estrés y las infecciones virales, estimulan el incremento en el hospedador de la actividad de elastasa en la mucosa nasal, lo cual puede disminuir las concentraciones de fibronectina y el incremento en la adherencia y colonización de *M. haemolytica*.<sup>22</sup> Adicionalmente, la neuraminidasa y la glicoproteasa producidas por *M. haemolytica* pueden alterar la secreción salival de tipo



mucosa o las glicoproteínas de superficie de las células, incrementando la adherencia de *M. haemolytica* al moco o al epitelio nasal.<sup>23,24,25</sup>

Las estructuras de superficie de *M. haemolytica* responsables de la adherencia son desconocidas. Las fimbrias han sido raramente encontradas en los aislamientos de *M. haemolytica*. Los polisacáridos capsulares, el LPS, las PME y los antígenos aglutinantes serotipo-específico, podrían asumir el papel de adhesinas en presencia o ausencia de fimbrias.<sup>30</sup>

Las variaciones en las condiciones de cultivo *in vitro* pueden modificar la expresión del LPS de *M. haemolytica* y variar la producción de proteínas, incluyendo las PME y las proteínas de choque térmico, por lo tanto las condiciones modificadas en cavidad nasal pueden estimular la expresión de proteínas o LPS que podrían incrementar la colonización nasofaríngea.<sup>26,27,28</sup>

Una vez que *M. haemolytica* gana el acceso al alvéolo pulmonar, los factores bacterianos estimulan una respuesta inflamatoria intensa y aguda. Estos factores bacterianos, asociados con los del hospedador, inducen daño tisular localizado y estimulan una respuesta sistémica asociada con el proceso inflamatorio. La endotoxina y la leucotoxina son los factores de virulencia mejor caracterizados con respecto a sus efectos en el alvéolo. La leucotoxina producto del crecimiento *in vitro* de *M. haemolytica*, está sumamente agregada y tiene baja actividad leucotóxica, pero puede ser disgregada con albúmina sérica bovina al 0.5% (BSA), resultando en un incremento de su actividad, el cual puede ocurrir durante la infección, debido al mayor aporte sanguíneo al alvéolo en los estadios tempranos de la enfermedad y al consecuente incremento de la permeabilidad capilar con el paso de albúmina a la luz alveolar.<sup>29,30,31</sup>

La leucotoxina induce citólisis de neutrófilos y plaquetas, lo cual produce daño al alvéolo debido a la liberación de enzimas lisosómicas y de radicales libres del oxígeno. Aparte de la actividad citotóxica, estudios recientes han mostrado que la leucotoxina modifica la función del neutrófilo, estas modificaciones incluyen aumento de la producción de mediadores de la inflamación como el leucotrieno B<sub>4</sub> y el ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico. Estos cambios pueden amplificar la respuesta inflamatoria, resultando en lesiones más severas o mejorando la bacteriolisis. Además las concentraciones

sublíticas de leucotoxina inhiben la blastogénesis de linfocitos bovinos, lo cual podría reducir las defensas inmunomediadas contra *M. haemolytica*.<sup>8,32,33,34</sup>

Se ha demostrado que la endotoxina de *M. haemolytica* es directamente tóxica al endotelio, por lo que puede incrementar la permeabilidad capilar a nivel alveolar. También se ha demostrado que la endotoxina daña el endotelio mediante la estimulación del factor de necrosis tumoral (TNF) y por la producción de interleucina-1 por macrófagos alveolares.<sup>35,36,37,38</sup> Este efecto puede ser mitigado por suero inmune o por la presencia de neutrófilos. Los estudios sobre las consecuencias de la interacción entre neutrófilos, endotoxina de *M. haemolytica* y endotelio han resultado en datos interesantes.

Las futuras determinaciones del papel que juegan los factores de virulencia de *M. haemolytica* en el desarrollo de la Pasteurelisis neumónica, recae en la generación de cepas mutantes de la bacteria, para la medición *in vitro* e *in vivo* de su virulencia. En la actualidad el desarrollo de cepas mutantes está teniendo mucho auge para el estudio del papel de varios factores de virulencia. El desarrollo de sistemas genéticos para el análisis de factores de virulencia en *M. haemolytica* fue lento, sin embargo, se han desarrollado métodos para la introducción de plásmidos en *M. haemolytica* por electroporación y conjugación, por lo que se han construido algunas cepas mutantes de *M. haemolytica*.<sup>39,40,41</sup>

Se determinó que una cepa mutante deficiente en leucotoxina induce lesiones en pulmón, jerarquizando la importancia de los otros factores de virulencia en la patogénesis de la enfermedad.<sup>40</sup> Esta cepa permitiría el estudio del mecanismo de interacción leucocito-*M. haemolytica* sin la complicación de la leucotoxina que induce daño celular, muerte e inactivación. Se construyeron mutantes de *M. haemolytica* que no sintetizan en alta proporción tres lipoproteínas de membrana. Estas lipoproteínas han mostrado homología con una lipoproteína de *H. influenzae* que mostró estar asociada con virulencia en un modelo de desafío en ratones.<sup>42,43,44</sup>

En la caracterización de PRH localizadas en la membrana externa y en el espacio periplásmico, se observan bandas con aparente peso molecular de 35, 70 y 100 kDa. Estudios más detallados revelan que la banda de 70 kDa es en realidad una mezcla de 3 proteínas distintas, una de las cuales contiene un epítopo serotipo-específico y no es regulada por hierro mientras las otras dos sí lo son. Una proteína asociada a la banda de

100 kDa es altamente inmunogénica (proteína que une transferrina), mientras que otra más abundante, asociada a esta misma banda, es menos inmunogénica. Se han detectado anticuerpos contra estas proteínas en suero y fluidos pulmonares de animales recuperados de Pasteurellosis.<sup>45,46</sup> Las proteínas reguladas por hierro incrementan significativamente la eficacia protectora de extractos libres de bacterias contra desafíos con los serotipos A2, A1, A6 y T10.<sup>47</sup>

En 1996, Lee y Shewen<sup>48</sup> determinaron la presencia de proteasas en sobrenadantes de cultivo parcialmente purificados y fraccionados a pH bajo. Estas proteasas tuvieron efecto sobre IgG<sub>1</sub> de bovinos, pero no así para IgA e IgM.

Las combinaciones de antígenos potencialmente protectores han dado resultados prometedores; por ejemplo, un sobrenadante de cultivo obtenido a partir del serotipo A1, conteniendo leucotoxina y complementado con LPS y material capsular, de la misma bacteria, confirió protección en corderos SPF desafiados con serotipos A1 y A2 y los niveles de anticuerpos neutralizantes de leucotoxina en suero correlacionaron con esta protección. Un detalle interesante, es que el efecto de una leucotoxina recombinante del serotipo A1, utilizada en combinación con vacunas conteniendo PRH, ocasionó inmunosupresión con efectos adversos sobre la protección.<sup>49</sup>

La cápsula de *M. haemolytica* del serotipo A2 esta compuesta por ácido colómico (ácido 2, 8 N-acetil neuramínico) el cual es idéntico al encontrado en *Neisseria meningitidis* grupo B. Un complejo capsular de *N. meningitidis* y una proteína de membrana externa protegió ratones contra el desafío de *M. haemolytica* A2, pero no estimuló la respuesta serológica en corderos SPF.<sup>50</sup>

Es importante considerar que la infección natural comúnmente resulta en un nivel alto de inmunidad en animales recuperados. Las vacunas vivas deberían inducir una respuesta inmune similar sin la necesidad de caracterizar antígenos protectores. No habría problema con estos productos si no fuera porque las cepas se alteran y se hacen menos virulentas. Estos procesos, por lo general eliminan antígenos que no sólo juegan un papel importante en la virulencia del agente, sino también en su efecto protector.

Caracterizar el perfil antigénico de bacterias patógenas, con el objetivo de elaborar vacunas inactivadas, puede ser discutible al utilizar cultivos *in vitro*. Las bacterias por lo general se adaptan modificando su fisiología en relación a su medio ambiente y los

antígenos que se producen *in vivo* no necesariamente se producen *in vitro* y viceversa, por lo que la caracterización de antígenos *in vivo* es de mayor relevancia. Teniendo identificadas las estructuras antigénicas que son potencialmente protectoras, la atención se encamina a su caracterización para incorporarlas a las vacunas para probar su eficacia.

## II.-OBJETIVO GENERAL

El propósito de este estudio fue determinar posibles diferencias en factores de patogenicidad de cepas de *Mannheimia haemolytica* A2, aisladas de diferentes cuadros neumónicos en borregos y de animales clínicamente sanos.

### 2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar *Mannheimia haemolytica* de cuadros neumónicos diversos, así como de animales clínicamente sanos (microbiota normal).
- Serotipificar las cepas aisladas.
- Evaluar la capacidad de producción de leucotoxina de las cepas aisladas.
- Determinar la producción de proteasas de secreción en diversos aislamientos de *M. haemolytica*.
- Realizar ensayos de adherencia de *M. haemolytica* en células del epitelio traqueal y en macrófagos alveolares de ovinos.
- Determinar el patrón de corte con dos endonucleasas de restricción de las cepas aisladas de microbiota normal y de origen neumónico.
- Evaluar la capacidad de cepas aisladas de diferente origen, para reproducir el cuadro neumónico en corderos.
- Determinar la presencia de leucotoxina de *M. haemolytica* en tejido pulmonar de animales inoculados experimentalmente.

### III.- MATERIALES Y MÉTODOS.

**3.1 Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* a partir de cuadros neumónicos y de microbiota normal en corderos.** Para el aislamiento de cepas a partir de animales muertos por neumonía, se contó con el apoyo de explotaciones comerciales en el área de influencia de la FES- Cuautitlán, UNAM y en el Municipio de Temoaya en el Estado de México; así como de otras en la delegación Tlalpan del D.F.; que tenían en conjunto una población aproximada de 400 corderos. Se realizaron visitas periódicas en estas explotaciones para recolectar cadáveres de corderos y determinar si la causa de muerte había sido neumonía; si éste era el caso, se procedía a tomar muestras representativas del pulmón en condiciones de esterilidad para realizar el aislamiento bacteriológico y obtener las cepas incluídas en el grupo: origen neumónico. En estas mismas explotaciones se tomaron muestras de cavidad nasal con hisopos estériles, con el fin de conformar el otro grupo de microbiota normal. El número de aislamientos recuperados de microbiota normal, se trató de homologar al número total de cepas recuperadas de animales muertos por neumonía.

El aislamiento e identificación de los agentes se realizó por métodos bacteriológicos convencionales.<sup>51</sup>

Para realizar los ensayos se seleccionaron únicamente aislamientos del serotipo A2, que fue el más frecuente y es el serotipo considerado más importante para ovinos. Se llevó a cabo la lotificación de los aislamientos con base en su origen.

### **3.2 Caracterización de los aislamientos de *M. haemolytica***

**Serotipificación y biotipificación.** Estos se realizaron mediante la técnica de hemoaglutinación indirecta descrita por Frank y Wessman<sup>52</sup> utilizando antisueros monoespecíficos de referencia<sup>b</sup>: Se cultivaron los diferentes aislamientos de *Mannheimia haemolytica* por separado, en placas de agar sangre, se cosecharon las bacterias a las 24 horas y se inocularon en tubos que contenían 10 ml de medio de infusión de cerebro y corazón (BHI) y se incubaron a 37<sup>0</sup>C en "baño serológico" en movimiento a 80 rpm durante 18 horas. Se inactivaron a 56<sup>0</sup>C por 30 minutos, posteriormente se dejaron

---

<sup>b</sup> Antisueros gentilmente donados por el Dr. Glynn Frank. National Animal Disease Center. Ames, Iowa.

enfriar a temperatura ambiente y se agregaron eritrocitos de carnero a una concentración del 1.0 % y se incubaron a 37°C durante 1 hr. Al concluir este período, se centrifugaron los tubos a 800 x g durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con solución salina amortiguada (SSA) por tres ocasiones, el paquete celular se resuspendió en SSA a una concentración final del 1% de eritrocitos y se adicionó formalina al 0.2%.

Se realizaron diluciones dobles de los antisueros de referencia en placas de microtitulación de 96 pozos de fondo en "U", se agregaron a todos los pozos los eritrocitos sensibilizados con cada uno de los aislamientos a una concentración del 0.1% y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de este periodo se observaron de manera directa los pozos donde existía aglutinación de eritrocitos, determinando así el serotipo al que correspondía cada aislamiento.

Se llevó a cabo la lotificación de los aislamientos con base en su origen y a partir de aquí se llevaron a cabo los análisis comparativos entre aislamientos de acuerdo a su origen: neumónico o microbiota normal.

**3.3 Capacidad de producción de leucotoxina de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* A2 de origen diferente.** Se preparó una suspensión estandarizada por método espectrofotométrico de cada una de las cepas aisladas a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml y fueron incubadas durante cuatro horas, hasta el inicio de la fase de crecimiento logarítmico, en medio RPMI-1640 adicionado con 7% de suero de ternera neonato (STN). Las suspensiones fueron centrifugadas a 3000 x g durante 20 minutos en refrigeración. El paquete bacteriano fue resuspendido en medio RPMI-1640 y el sobrenadante fue etiquetado como "1er. sobrenadante". La suspensión bacteriana se incubó nuevamente a 37°C durante dos horas en movimiento constante a 80 rpm (fase de crecimiento logarítmico y de alta producción de leucotoxina<sup>11</sup>). Al final de este período las muestras se centrifugaron por 20 min a 3000 x g. El paquete celular se desechó y el sobrenadante se etiquetó como "2o. sobrenadante".

La cantidad de leucotoxina presente en el 1er. y 2o. sobrenadante de cada una de las cepas, se evaluó mediante un ensayo visual simple, descrito por Shewen en 1983<sup>53</sup> y por ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA-I).<sup>54</sup>

**3.3.1 Ensayo visual simple para la determinación de leucotoxina de *M. haemolytica*.** Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tiene la leucotoxina de *M. haemolytica* de lisar leucocitos de sangre periférica de bovino obtenidos mediante choque hipotónico de sangre completa (Sección 3.3.1.1). Se realizaron diluciones dobles en medio RPMI-1640 con STN de los sobrenadantes de cultivo, obtenidos a las 4 y 6 horas de incubación, en microplacas de titulación de 96 pozos de fondo plano. A las diluciones de sobrenadantes se adicionaron 100  $\mu$ L de una suspensión de leucocitos a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml y se incubaron durante 1 hr a 37°C. Al finalizar este periodo, las placas se centrifugaron a 800 x g por 5 min. A cada pozo se le adicionó SSA formalinizada al 10% y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente se tiñeron las placas con una solución de cristal violeta al 1% durante 10 min, lavándolas finalmente con agua corriente. Un fondo azul en los pozos indicaba la presencia de células teñidas y por lo tanto la ausencia de leucotoxina de *M. haemolytica* en los sobrenadantes. Un fondo claro indicaba la ausencia de células por la presencia de leucotoxina, que había ejercido su efecto de lisis sobre las células "blanco", eliminando el sustrato celular a teñir.<sup>53</sup>

**3.3.1.1 Obtención de leucocitos desde sangre periférica.** Se tomaron muestras de sangre periférica de bovino con tubos al vacío, los cuales contenían heparina como anticoagulante. La sangre se depositó en un matraz, al cual se le adicionó la misma cantidad de agua destilada por 30 seg., provocando el choque hipotónico que produce la lisis de los eritrocitos. Posteriormente se le agregó la misma cantidad de SSA concentrada a 2X, con lo cual se detuvo la lisis eritrocítica. Estos se centrifugaron a 800 x g por 5 min, este procedimiento se realizó hasta obtener el paquete globular blanco, libre de eritrocitos. Se estandarizó la concentración a  $5 \times 10^6$  células/ml y fueron resuspendidas en RPMI-1640.<sup>55</sup>

**3.3.2 ELISA-I<sup>54</sup> para medir la cantidad de leucotoxina producida en sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica*.**

**3.3.2.1 Purificación del antígeno (leucotoxina de *M. haemolytica*).** La leucotoxina de *M. haemolytica* es producida en mayor cantidad en la fase de crecimiento logarítmico<sup>11</sup>. Se cultivó una cepa de referencia serotipo A2 hasta su fase de crecimiento



logarítmico, como se describe en la sección 3.3, hasta obtener los sobrenadantes de cultivo (1er y 2o. sobrenadante). Se determinó mediante el ensayo visual simple si estos sobrenadantes tenían efecto citotóxico sobre leucocitos obtenidos de sangre periférica (sección 3.3.1).

La cantidad de proteína presente en los sobrenadantes se cuantificó por el micrométodo de Bradford.<sup>56</sup> Se realizó un análisis electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas presentes en los sobrenadantes para verificar la presencia de bandas sugerentes de la leucotoxina de *M. haemolytica* (bandas de 104 kDa). Verificado esto, se procedió a precipitar las proteínas de los sobrenadantes con dos volúmenes de etanol frío durante 24 horas a -20°C. Transcurrido este período, las muestras se centrifugaron a 6 000 x g durante 20 min y las pastillas fueron reconstituidas con solución salina amortiguada. La muestras fueron dializadas contra dos cambios de agua destilada y dos de solución salina amortiguada de fosfatos utilizando una membrana de diálisis con un límite de exclusión de 12 kDa.

Las proteínas en los dializados fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE y la parte de los geles que contenían las bandas cercanas a los 104 kDa fueron cortadas. Los fragmentos de los geles obtenidos fueron sometidos a electroelución para obtener la proteína purificada. Se cuantificó nuevamente la cantidad de proteína purificada y se comprobó la presencia de la leucotoxina de *M. haemolytica* por electroforesis SDS-PAGE; así como su actividad citotóxica por ensayo visual.

**3.3.2.2. Producción del anticuerpo anti-leucotoxina.** La proteína purificada fue inoculada por vía subcutánea en dos conejos Nueva Zelanda a una dosis de 1.0 mg. El inóculo fue acompañado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund. Se llevaron a cabo tres inoculaciones con intervalo de una semana y una última inoculación por vía intravenosa con la misma dosis pero sin adyuvante. Tres días después de la última inoculación, se tomó una muestra de sangre de los conejos para la obtención de suero.

Los sueros fueron probados para determinar la presencia de anticuerpos contra la leucotoxina de *M. haemolytica* por medio de una inmunoelectrotransferencia, para lo cual, se realizó un corrimiento electroforético de la proteína purificada (leucotoxina), fue transferida a papel de nitrocelulosa a 400 mA durante una hora y enfrentada al primer

anticuerpo obtenido en conejo. Posteriormente se adicionó proteína G conjugada con peroxidasa como segundo anticuerpo y fue revelada con diamino-bencidina y peróxido de hidrógeno.

### 3.3.2.3 ELISA-indirecto<sup>54</sup>

**Estandarización de la prueba:** Para determinar si el antígeno era detectado y que diluciones del suero y del conjugado eran las mas adecuadas, se llevó a cabo la estandarización. Se utilizó como antígeno la proteína purificada (leucotoxina) a diferentes concentraciones (1, 3, 5, 10, 15 µg) y el suero del conejo a varias diluciones (1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64), así como dos diluciones del conjugado (1:1 000 y 1:2 000). El procedimiento que se describe a continuación se utilizó para la estandarización de la técnica y para los ensayos para determinar la cantidad de leucotoxina en los sobrenadantes de cultivo de los diferentes aislamientos de *M. haemolytica*.

El antígeno a sus diferentes concentraciones (ajustado a un volumen final de 50 µL) fue adsorbido a los pozos de las placas durante toda la noche a 4°C . Se decantó el antígeno y se lavó dos veces la microplaca con la solución de lavado. Se realizó el bloqueo de los sitios donde no hubo adsorción del antígeno con una solución de leche descremada al 2.0 % y se adicionó el primer anticuerpo a las diluciones mencionadas y se incubó por 30 min a 37°C. Se lavó y adicionó la Proteína G conjugada con peroxidasa a una dilución 1:1 000 ó 1:2 000 en solución de amortiguadora tris-ELISA (trizma base 50 mM, cloruro de sodio 148 mM, pH 7.4) y se incubó 30 min a 37°C. Finalmente la placa se lavó y se reveló con ABTS [2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) y peróxido de hidrógeno. Las placas fueron leídas a una longitud de onda de 405 nm. La concentración final de la leucotoxina que se utilizó fue de 5.0 µg.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza. Las diferencias entre medias ( $p < 0.05$ ) se determinaron mediante una prueba de Duncan.

**3.4 Producción de proteasas de secreción de aislamientos de *M. haemolytica* de diferente origen.** Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo de diferentes aislamientos de *M. haemolytica* a las 6, 12, 18 y 24 hrs de incubación a 37 °C en medio líquido BHI con movimiento constante a 80 rpm. Las proteínas presentes en los sobrenadantes obtenidos

a los diferentes tiempos de incubación, fueron precipitadas con etanol absoluto frío durante 24 horas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las suspensiones se centrifugaron a  $8\ 000\ \times\ \text{g}$  durante 20 minutos y el precipitado se resuspendió con SSA, se determinó la concentración de proteína por el micrométodo de Bradford. Se realizaron corrimientos electroforéticos de estas suspensiones en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizada con 0.1 % de gelatina. Después del corrimiento los geles fueron lavados durante 45 min con una solución de triton X-100 al 0.5 %, posteriormente fueron sumergidos en una solución de activación ( $\text{CaCl}_2\ 0.1\ \text{M}$ ), teñidos con azul de Comassie y parcialmente desteñidos con una solución de ac. acético-metanol-agua<sup>81</sup>.

**3.4.1. Dependencia de las proteasas de secreción de *M. haemolytica* a iones divalentes.** Una vez demostrada la presencia de proteasas de secreción en los sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica*, se determinó la dependencia de estas proteasas a iones divalentes en los que se puede incluir el calcio. Una fracción de cada uno de los sobredantes con efecto de proteasa comprobado, fue sometido a la acción del quelante etilen diamino tetracetato de sodio (EDTA 10 mM).<sup>81</sup> Posteriormente se procedió a realizar el análisis electroforético SDS-PAGE copolimerizado con gelatina, descrito arriba.

**3.4.2. Estabilidad en la producción de proteasas de aislamientos de *M. haemolytica*.** Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo de los diferentes aislamientos de *M. haemolytica* a partir de 10 pases seriados de la bacterias en agar sangre con intervalo de 24 horas. La detección de proteasas en estos sobrenadantes se realizó de acuerdo a la técnica descrita en la sección 3.4 para determinar si se perdía la capacidad de producción de proteasas con los pases *in vitro*.

**3.5 Adherencia de *M. haemolytica* a células del epitelio traqueal y a macrófagos alveolares.** A partir de ocho corderos, se obtuvieron células del epitelio traqueal mediante raspado de la mucosa y se obtuvieron macrófagos alveolares mediante lavado bronquio-alveolar. Los dos tipos celulares fueron suspendidos por separado en SSA pH 7.4 y se

realizaron tres lavados a 800 x g durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas finalmente a una concentración de  $1 \times 10^6$  por ml en medio RPMI-1640.

Los ensayos de adherencia se realizaron para los dos tipos de células por separado (Cuadro 1). Después de los lavados, las células fueron depositadas en microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo en "U". Posteriormente se adicionaron bacterias de los diferentes aislamientos de *M. haemolytica*, las cuales estaban suspendidas en medio RPMI-1640 y ajustada a una concentración de  $900 \times 10^6$  UFC/ml, de tal manera que quedara una relación final de 100 bacterias por célula. Las células junto con las bacterias fueron incubadas por periodos de 15 minutos para macrófagos y 30 minutos para las células del epitelio traqueal a 37°C con movimiento ligero (20 rpm). Al terminar el periodo de incubación se tomaron 3 alícuotas de 20 µL de las suspensiones y fueron depositadas en portaobjetos, se dejaron secar y fueron fijadas con metanol absoluto y posteriormente teñidas con tinción de Wright. De cada preparación se contaron las bacterias adheridas a la superficie de 10 células tomadas al azar.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y la comparación de medias se realizó con la prueba de Duncan.

**3.6 Análisis de los patrones de corte con endonucleasas de restricción de los diferentes aislamientos de *M. haemolytica*.**<sup>56</sup> A partir de 15 aislamientos de *M. haemolytica* de origen microbiota, 15 de origen neumónico y una cepa de referencia serotipo A2, se extrajo el ADN para hacer cortes con endonucleasas de restricción y analizar por electroforesis el patrón de corte con estas enzimas.

**3.6.1 Extracción de ADN cromosómico.** Todos los aislamientos fueron cultivados por separado en medio sólido de BHI. Se cultivaron 5 placas de cada una de las cepas (15 de microbiota y 15 de origen neumónico) durante 24 horas a 37°C. Después de este período fueron recolectadas las colonias en 5.0 ml de SSA, centrifugadas a 5 000 x g y sometidas a un método de extracción fenólica (fenol-agua), el cual utiliza lisozima, proteinasa K y precipitación con alcohol etílico absoluto; el ADN fue suspendido en amortiguador TE. En este caso se utilizó la enzima RNAsa para eliminar el ARN.

Después, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1%, adicionadas con bromuro de etidio<sup>56</sup>. La cantidad de ADN presente en las muestras fue determinada a una longitud de onda de 260 nm.

**3.6.2 Ensayo de corte con endonucleasas de restricción y análisis de los perfiles de corte.** En primera instancia se realizó una cinética de corte para determinar con cuál enzima y a qué tiempo se lograba el corte de restricción; las enzimas probadas fueron *EcoR* I, *EcoR* V, *BamH* I, *Sal* I y *Xho* I y los tiempos de la cinética se tomaron cada 10 minutos hasta las 2 horas. El mejor comportamiento se obtuvo con *EcoR* I y *BamH* I. Sin embargo, el tiempo no fue suficiente para el corte, por lo que se realizaron más ensayos a más tiempo determinándose un mejor corte a las 24 horas. La inactivación de las enzimas se realizó a 60°C durante 10 minutos.

De cada uno de los aislamientos (microbiota y neumónicos) se realizaron cortes con endonucleasas de restricción, para lo cual en microtubos estériles se adicionaron 20 µL del amortiguador (10 X) de la enzima, 5 µL (30 µg) de ADN problema, 150 µL de agua destilada estéril y de 30-150 U de la enzima. Se incubó la mezcla toda la noche a 37°C, la extracción de ADN se llevó a cabo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol frío absoluto. Se realizaron corrimientos electroforéticos de las muestras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 5% a 60 V durante 4 a 5 horas.<sup>56</sup> Los geles fueron teñidos con nitrato de plata. Se realizó un estudio comparativo de cepas de *Mannheimia haemolytica* en relación al patrón de corte con enzimas de restricción.

### **3.7 Infección experimental con *Mannheimia haemolytica* A2 aislada de diferentes cuadros neumónicos y de microbiota normal.**

**3.7.1 Animales.** Se utilizaron 13 corderos de aproximadamente 2 meses de edad con títulos de anticuerpos anticápsula de *Mannheimia haemolytica* inferiores a 1:4 y seronegativos), estos animales fueron distribuidos al azar en 3 grupos. El grupo 1, de

cinco animales, fue inoculado con cinco aislamientos de origen neumónico; el grupo 2, de cinco animales, con cinco aislamientos de origen microbiota; y el grupo 3, de tres animales, sirvió como grupo testigo y fue inoculado con SSA.

El protocolo de inoculación se resume en el Cuadro 2.

Del día 0 al 14, se le tomó la temperatura a los animales por vía rectal diariamente. Los animales de los tres grupos fueron inoculados con dexametasona a una dosis de 4.0 mg/día por vía intramuscular del día 0 al 10, con el fin de producir inmunosupresión. El día 7 se inoculó a todos los animales por vía intratraqueal 2.0 ml de una suspensión que contenía el virus de PI<sub>3</sub> a una concentración de  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml.

**3.7.2. Suspensiones bacterianas.** Cada uno de los aislamientos a evaluar, fue cultivado durante 18 horas en agar BHI a 37°C. Después de este período fueron cosechadas y lavadas 3 veces por centrifugación a 3 000 x g y resuspendidas en SSA a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Cada animal fue inoculado con diferente aislamiento por vía intratraqueal utilizando 2.0 ml de la suspensión bacteriana.

**3.7.3. Evaluación de lesiones.** El día 14 los animales fueron sacrificados y los pulmones fueron separados para evaluar el grado de lesión. Se tomaron muestras representativas del pulmón para análisis histopatológico y para inmunohistoquímica, así como para análisis bacteriológico.

El análisis histopatológico se realizó a partir de las muestras fijadas con formalina amortiguada al 10% y procesadas con la técnica usual de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina.<sup>57</sup> Las muestras incluidas en parafina también fueron utilizadas para obtener los cortes para la inmunohistoquímica, que se describe más adelante (Sección 3.8).

Las muestras para el análisis bacteriológico fueron procesadas por métodos convencionales para el aislamiento e identificación de *M. haemolytica*.

### **3.8 Detección de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* A2 en el pulmón de corderos inoculados experimentalmente.**

**3.8.1 Muestras.** Para este estudio se utilizaron los pulmones de los corderos inoculados con *M. haemolytica* A2 del ensayo anterior. Para la inmunohistoquímica se utilizaron los tejidos fijados en formalina, un anticuerpo antileucotoxina y como segundo anticuerpo proteína G conjugada con peroxidasa (1:2000). El anticuerpo contra la leucotoxina fue elaborado por inoculación de leucotoxina purificada en conejos (Sección 3.3.3.1 y 3.3.2.2).

En la Figura 1, se resume el esquema de trabajo para determinar las diferencias en las propiedades patogénicas de *Mannheimia haemolytica* de origen diferente en corderos.

## ESQUEMA DE TRABAJO



Figura 1. Esquema de trabajo para la evaluación de mecanismos de patogenicidad de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* A2 productoras de neumonías en ovinos.



**Cuadro 1. Modelo establecido para la evaluación de la adherencia de *M. haemolytica* de origen neumónico o microbiota a células del sistema respiratorio de corderos.**

<p>ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS (Número de aislamientos evaluados)</p> <p>CELULAS EVALUADAS</p>	<p><b>MICROBIOTA</b></p> <p>( 5 )</p>	<p><b>NEUMÓNICO</b></p> <p>( 5 )</p>	<p><b><i>M. haemolytica</i></b></p> <p><b>A2. Cepa de referencia.</b></p> <p>( 1 )</p>
<p><b>Macrófagos Alveolares</b> <b>(de 8 animales)</b></p>	<p>3 repeticiones (10 células por repetición)</p>	<p>3 repeticiones (10 células por repetición)</p>	<p>3 repeticiones (10 células por repetición)</p>
<p><b>Células del epitelio traqueal</b> <b>(de 8 animales)</b></p>	<p>3 repeticiones (10 células por repetición)</p>	<p>3 repeticiones (10 células por repetición)</p>	<p>3 repeticiones (10 células por repetición)</p>

**Cuadro 2. Protocolo de desafío con *Mannheimia haemolytica* A2 de origen neumónico y de microbiota.**

DIA	NEUMÓNICO	MICROBIOTA	TESTIGO
0	Inoculación Viral** 2.0 ml $1 \times 10^7$ TCID <sub>50</sub> /ml.		
7	<i>Mannheimia haemolytica</i> A2 vía INTRATRAQUEAL 2.0 ml (1x10 <sup>9</sup> UFC/ml)		SSA 2.0 ml vía Intratraqueal
14	SACRIFICIO		
** Se utilizó una cepa del virus de Parainfluenza 3 (PI3) gentilmente donada por el Dr. H. Ramírez de la Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM, Departamento de Producción Animal, Cerdos.			

## IV. RESULTADOS

**4.1 Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* a partir de pulmones neumónicos y de microbiota normal de corderos.** Como puede observarse en el Cuadro 3, se obtuvieron un total de 70 aislamientos de *M. haemolytica* a partir de 148 muestras de hisopos nasales y de 77 muestras de pulmón. De estos aislamientos, 45 fueron de origen microbiota y 25 de origen neumónico. El serotipo que se aisló con mayor frecuencia para ambos casos fue el serotipo A2. Debido a esta situación, este fue el serotipo que se utilizó para todas las evaluaciones. También se obtuvieron aislamientos de *Pasteurella multocida*, correspondiendo al 12% a partir del total de muestras de microbiota y 7% de neumónicos. El resto de los aislamientos con su serotipo se muestra en el Anexo 1.

**4.2 Capacidad de producción de leucotoxina de los aislamientos de *Mannheimia haemolytica* A2.** Se realizó un primer ensayo para determinar la capacidad de producción de leucotoxina por parte de los diferentes aislamientos utilizando un ensayo visual simple, el número de aislamientos por origen fue de 15. Los títulos de leucotoxina para las cepas de los diferentes orígenes que se muestran en la Figura 2 fueron transformados a logaritmo base 2 ( $\text{Log}_2$ ). Como se observa, las cepas de origen neumónico tuvieron mayor capacidad de producción de leucotoxina. El valor alcanzado por los aislamientos de origen neumónico fue 4.8, que equivale aproximadamente a un título de 1:32, en tanto para microbiota resultó de 1:8.

Para confirmar estos resultados aplicó el método de ELISA indirecto. Como primer paso se identificó y purificó la leucotoxina de *M. haemolytica*. En la Figura 3 se muestra el resultado de una electroforesis, realizada a sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* obtenidos después de cuatro y seis horas de incubación. A las cuatro horas de incubación en medio RPMI-1640 adicionado con STN (carriles 2 y 3), se observan dos bandas principales de 70 y 105 kDa que podrían corresponder a la albúmina sérica bovina contenida en el suero de ternera y a la leucotoxina de *M. haemolytica*, respectivamente.

En el segundo sobrenadante (carriles 4 y 5), la banda de 105 kDa se observa más evidente y corresponde a la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria.

En la Figura 4 se muestran los mismos sobrenadantes en un gel al 10% teñido con nitrato de plata. En este caso se observan más evidentes las bandas que corresponden a la leucotoxina y a la albúmina.

Para purificar la leucotoxina se determinó primero la concentración de proteína a la cual se diferenciaba la leucotoxina de otras proteínas presentes en el sobrenadante en geles de poliacrilamida a concentraciones diferentes (8, 10 y 12%) (Figs. 5 y 6). La concentración de proteína elegida para realizar los cortes del gel y posterior electroelución fue de 15 µg de proteína total por carril.

Después de haber realizado la electroelución se cuantificó por el método de Bradford la cantidad de proteína recuperada. Se comprobó el efecto citotóxico de la leucotoxina utilizando leucocitos de sangre periférica y se ajustó la concentración de proteína a un mg/ml. Después de la inoculación a los conejos, se obtuvo el suero y se realizó la inmunotransferencia utilizando un sobrenadante de cultivo de *M. haemolytica* obtenido en fase de crecimiento logarítmico. Los resultados del inmunotransferencia se observan en la Figura 7. Es evidente la presencia de una banda de reconocimiento de 105 kDa que corresponde a la leucotoxina. También, es apenas perceptible una banda de 70 kDa, que sugiere un reconocimiento discreto a la albúmina sérica bovina.

Los resultados comparativos de la capacidad de producción de leucotoxina entre las diferentes cepas de acuerdo a su origen y cuantificada por la técnica de ELISA, se muestran en la Figura 8. Las tres primeras barras corresponden a la cantidad promedio de leucotoxina producida por las cepas durante las cuatro primeras horas de incubación a 37°C. En este caso, se incluyó un tercer grupo de cepas que fueron recuperadas de pulmones de corderos, después de un ensayo de inoculación experimental.

Los aislamientos de origen neumónico y las del grupo de recuperadas fueron las que más capacidad de producción de leucotoxina mostraron, con una lectura de

absorbancia a 405 nm de  $0.464 \pm 0.09$  y  $0.524 \pm 0.07$  respectivamente, comparadas con las de origen microbiota donde se obtuvo un valor de  $0.374 \pm 0.12$  ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en la fase logarítmica de crecimiento, a pesar de observarse un comportamiento similar al de las primeras cuatro horas, la cantidad de leucotoxina producida en los tres grupos fue menor.

En ambos casos, a pesar de observarse mayor capacidad de producción en las cepas recuperadas, no existió diferencia con las de origen neumónico ( $p > 0.05$ ), aunque sí con las de microbiota.

**4.3.- Adherencia de *Mannheimia haemolytica* A2 a macrófagos y células del epitelio traqueal.** En las Figuras 9 y 10 se muestra la técnica de obtención de macrófagos mediante lavado bronquioalveolar, así como las imágenes de las células obtenidas en el lavado bronquioalveolar y en el raspado traqueal para la obtención de células ciliadas del epitelio traqueal. El número promedio de células recuperadas fue de  $70.3 \pm 6.7 \times 10^4$  macrófagos por ml. y  $64.2 \pm 8.3 \times 10^4$  células ciliadas por ml.

En las Figuras 11 y 12 se observan algunas células con bacterias adheridas a la superficie. Como puede observarse, existió una mayor adherencia a los cilios de las células del epitelio traqueal.

Al cuantificar la capacidad de adherencia a células del epitelio traqueal de los aislamientos de los diferentes orígenes, se observó una mayor capacidad para las cepas de origen neumónico y la de referencia,  $5.7 \pm 1.2$  y  $6.1 \pm 0.5$  bacterias por célula, respectivamente, que para las de origen microbiota, donde se observó un promedio de bacterias adheridas de  $4.2 \pm 0.7$  por célula ( $p < 0.05$ ). En el grupo control fue de  $1.2 \pm 0.6$  (Figura 13). En el caso de macrófagos alveolares el grado de adherencia fue menor, comparado con la adherencia a células del epitelio traqueal. Los promedios de adherencia fueron de  $2.6 \pm 0.3$ ,  $3.5 \pm 0.4$ ,  $3.5 \pm 0.3$ ,  $2.5 \pm 0.2$  para microbiota, neumónico, referencia y

control respectivamente; sin observarse diferencia significativa entre tratamientos (Figura 14).

**4.4 Producción de proteasas de secreción de aislamientos de *M. haemolytica* de diferente origen.** Los resultados de esta evaluación fueron de tipo cualitativo. Como puede observarse en la Figura 15, el efecto proteolítico de los sobrenadantes de cultivo sobre los geles copolimerizados con gelatina al 0.1% fueron más evidentes para los aislamientos de origen neumónico. Sin embargo, algunos aislamientos, independientemente de su origen, mostraban efectos de diferente intensidad. Donde se observó diferencia cuantitativa, fue en la frecuencia en la que existía actividad de proteasa. El 88% de los aislamientos de origen neumónico presentaron esta capacidad, comparado con el 55% de los de origen microbiota (Cuadro 4). La capacidad de producir proteasas se mantuvo aún después de 10 pases *in vitro* de los diferentes aislamientos (Figura 16). También se demostró la dependencia de calcio de las proteasas, debido a que la actividad proteolítica se perdía en ausencia de calcio y en presencia de EDTA, con lo cual las proteasas detectadas se pueden clasificar dentro del grupo de las metaloproteasas (Figura 17).

**4.5 Análisis de los patrones de corte con endonucleasas de restricción de los diferentes aislamientos de *M. haemolytica*.** Como ya se mencionó en la sección de metodología, las enzimas que mostraron un comportamiento mejor fueron *BamH I* y *EcoR V*. En la cinética de corte se demostró que a las 24 horas se observaba un mejor perfil de corte para las diferentes enzimas. Por esa razón, los resultados que se muestran en todos los casos corresponden al patrón de corte a las 24 horas de incubación con la enzima respectiva.

En la Figura 18, se muestran de manera comparativa los perfiles de corte con la enzima *EcoR V* de los aislamientos de *M. haemolytica*. Los aislamientos de origen

neumónico muestran una diferencia importante por debajo de la banda de 2322 pb, donde se observa una doble banda, comparada con la banda sencilla que se observa para los aislamientos de origen microbiota. Este comportamiento se observó en 12 de los 15 aislamientos de origen neumónico. Por otro lado, un efecto similar se observa en el perfil de corte con *BamH I* (Figura 19), sólo que el efecto se observa por encima de la banda de 564 pb. Esta diferencia se detectó en 10 de los 15 aislamientos. Sólo en 8 aislamientos se observó diferencia con el uso de las dos endonucleasas de manera simultánea.

**4.6 Infeccion experimental con *Mannheimia haemolytica* A2 aislada de diferentes cuadros neumónicos y de microbiota normal.** Los registros de temperatura corporal en los diferentes grupos demostraron una elevación discreta de temperatura en todos los grupos después de la inoculación del virus de la PI<sub>3</sub> (día 1), este aumento de temperatura se mantuvo por un lapso de 5 días. Después de la inoculación de las bacterias (día 8) se observó otro aumento de temperatura en los grupos neumónico y microbiota. Fue más evidente el aumento de temperatura en el grupo neumónico ( $p < 0.05$ ) (Figura 20).

En el grupo inoculado con los aislamientos de origen neumónico, dos animales murieron antes de las 18 horas pos-inoculación de la suspensión bacteriana (día 8). En estos animales no se observaron cambios patológicos aparentes a nivel pulmonar, sin embargo se observó un cuadro congestivo generalizado sugerente de una condición de choque endotóxico. Los otros tres animales de este grupo mostraron signos de enfermedad respiratoria a partir del día 3 pos-inoculación bacteriana (día 10), que incluyeron fiebre, disnea, tos, aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria, así como respiración abdominal. Uno de estos animales murió al día 6 pos-inoculación bacteriana (día 13). Las lesiones macroscópicas en los tres animales que manifestaron signos de enfermedad respiratoria, se observan en la Figura 21. En esta misma figura se muestran de manera comparativa los cambios observados en el grupo inoculado con los

aislamientos de origen microbiota y los del grupo testigo. Es evidente la mayor severidad de las lesiones observadas en el grupo neumónico y la ausencia de lesiones en el grupo testigo sin inocular. En el grupo microbiota se observaron lesiones discretas sugerentes de neumonía. El pulmón del animal identificado con el número 292 fue el que murió al día 6 pos-inoculación y se observó una neumonía fibrinosa craneo-ventral afectando básicamente el lóbulo craneal derecho. El animal 269 mostró en pulmón una neumonía de tipo lobular, también de distribución craneo-ventral; se observó la distribución típica de una bronconeumonía. En el análisis histopatológico se observó una neumonía intersticial fibrinosa en el primer caso y una bronconeumonía exudativa en el segundo (Figura 22).

En el análisis bacteriológico se logró el aislamiento de *M. haemolytica* serotipo A2 a partir de sangre, hígado, pulmón, riñón y líquido cefalorraquídeo de los animales que presentaron muerte súbita del grupo neumónico y a partir del pulmón de los demás animales de este grupo. En el grupo microbiota, sólo se aislaron bacterias de dos animales del grupo a partir de lesiones discretas en pulmón.

**4.7 Detección de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* A2 en el pulmón de corderos inoculados experimentalmente.** Los resultados obtenidos demostraron la presencia de la leucotoxina de *M. haemolytica* en el tejido pulmonar de los animales inoculados. Ésta fue detectada principalmente en el tejido linfoide asociado a bronquios y en pequeños cúmulos dispersos en el tejido cercano a las zonas de inflamación. Al observar las preparaciones con mayor detalle, se observó una reacción fuerte asociada a células, especialmente en leucocitos mononucleares (Figura 23). Las reacciones más fuertes se observaron en el animal 292 del grupo neumónico. Reacciones más discretas se apreciaron en el grupo microbiota y en el grupo testigo no se observó reacción.



**Cuadro 3. Aislamiento y tipificación de *Mannheimia haemolytica* en ovinos.**

<b>ORIGEN</b>	<b><i>Mannheimia haemolytica</i></b>	<b><i>Pasteurella multocida</i></b>
<b>MICROBIOTA</b>	45	19
Serotipo más común	A2 (80 %)	
<b>NEUMÓNICO</b>	25	6
Serotipo más común	A2 (75 %)	
<b>Total</b>	70	25

**Cuadro 4. Actividad de proteasa en sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* A2 de diferente origen.**

<b>ORIGEN</b>	<b>No. de cepas con actividad /total</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>MICROBIOTA</b>	25/45	55
<b>NEUMÓNICO</b>	22/25	88

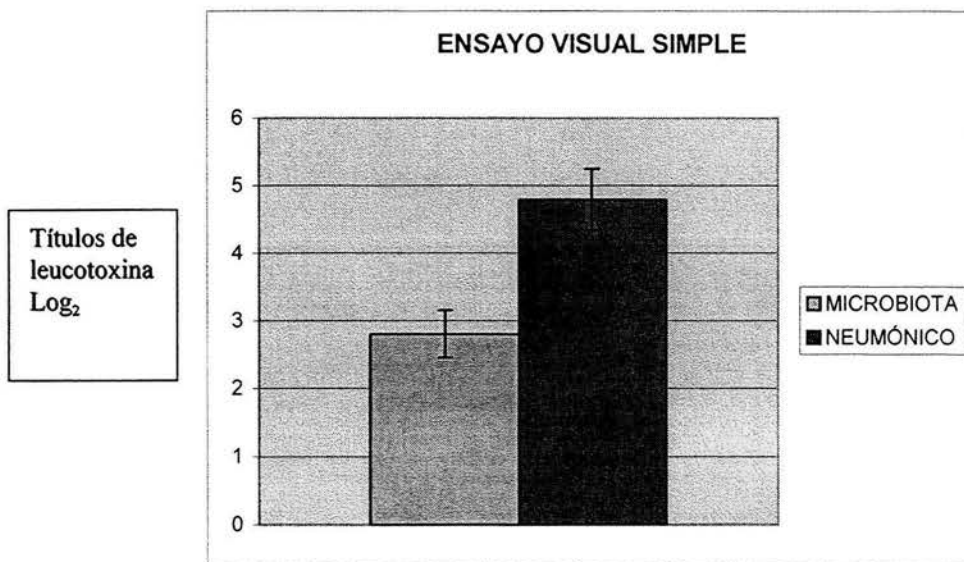
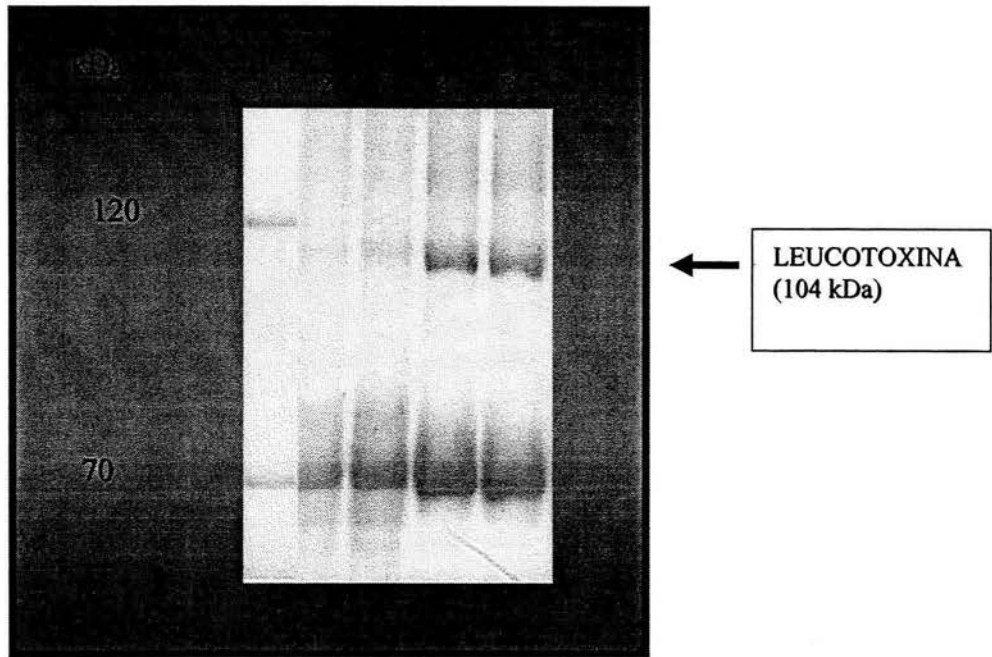
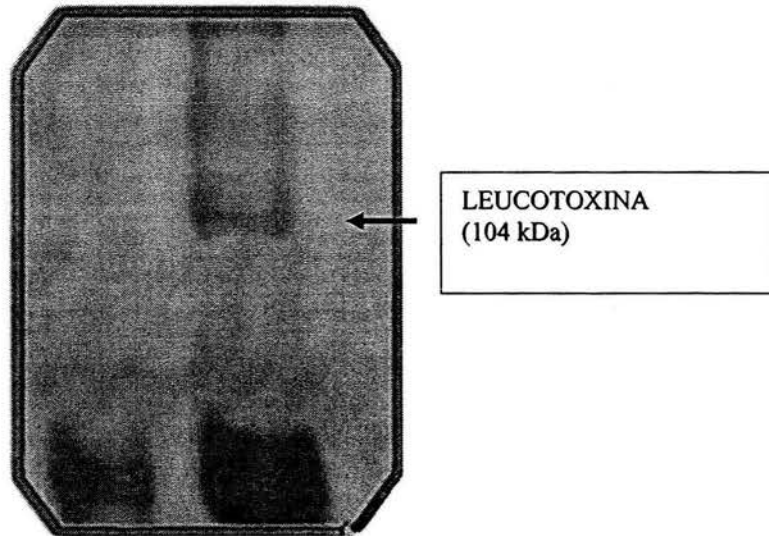


Figura 2. Capacidad de producción de leucotoxina de aislamientos de diferente origen de *M. haemolytica* en corderos, mediante la prueba de Ensayo Visual Simple. Para ambas cepas n=15.



**Figura 3.** Evidencia de la presencia de leucotoxina en sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* obtenidos a las 4 y 6 horas de incubación a 37°C. Carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2 y 3: sobrenadantes obtenidos a las 4 horas; carriles 4 y 5: sobrenadantes obtenidos a las 6 horas de incubación. Cantidad de proteína por carril: 10 µg. Electroforesis SDS-PAGE (Gel al 10 %).



**Figura 4.** Evidencia de la presencia de leucotoxina en sobrenadante de cultivo de *Mannheimia haemolytica*. Electroforesis SDS-PAGE Teñido con nitrato de plata (Gel al 10 %).

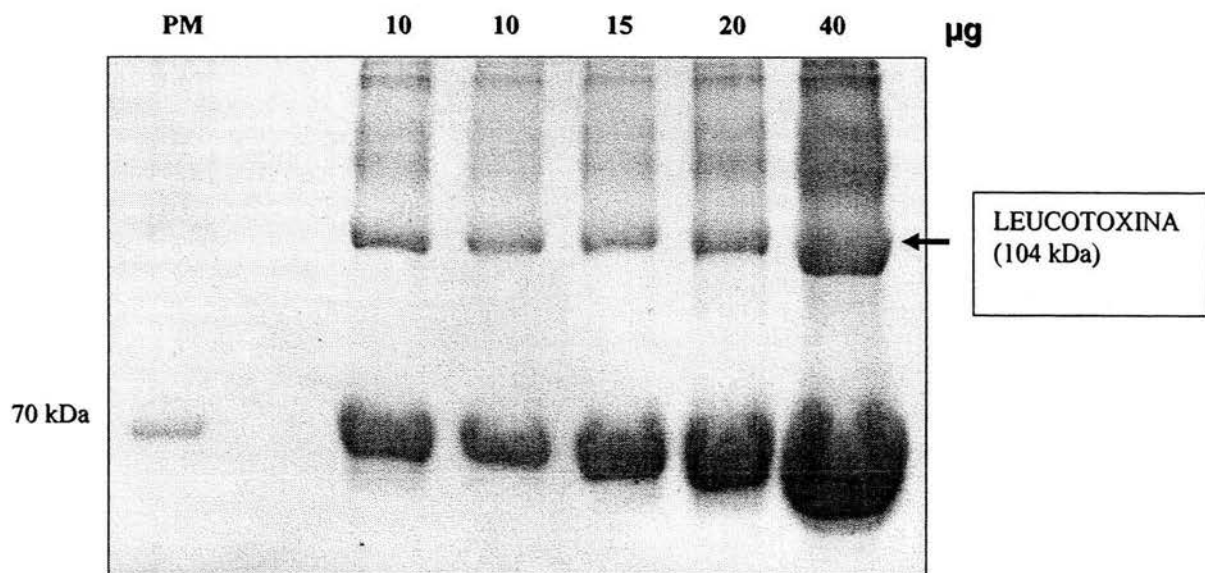


Figura 5. Concentraciones diferentes de proteína en geles SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica*

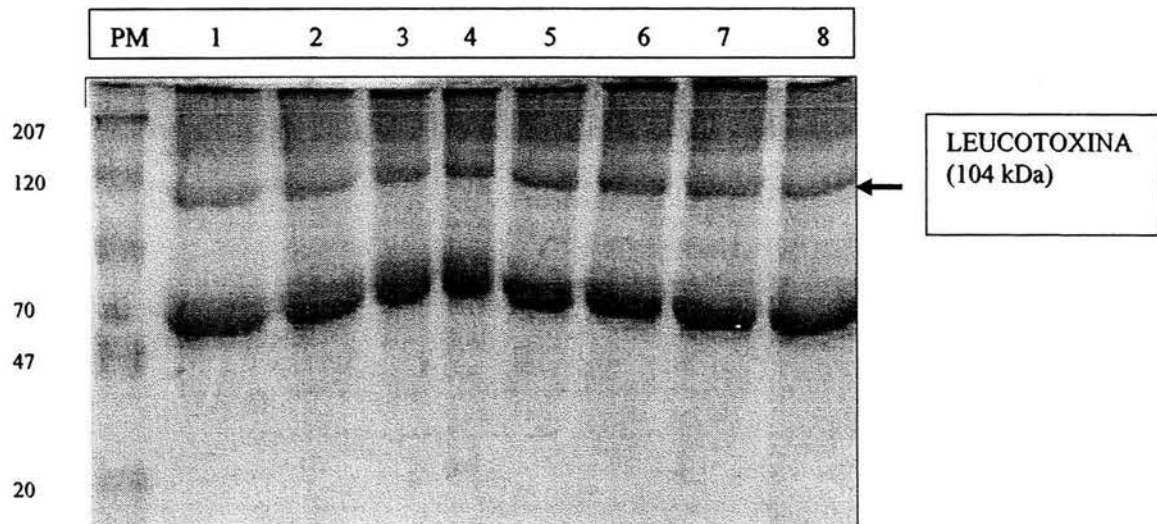


Figura 6. Carriles del 1 al 7 sobrenadante de cultivo de *Mannheimia haemolytica*, fase de crecimiento logarítmico en RPMI-1640 adicionado con 3 % de ASB.

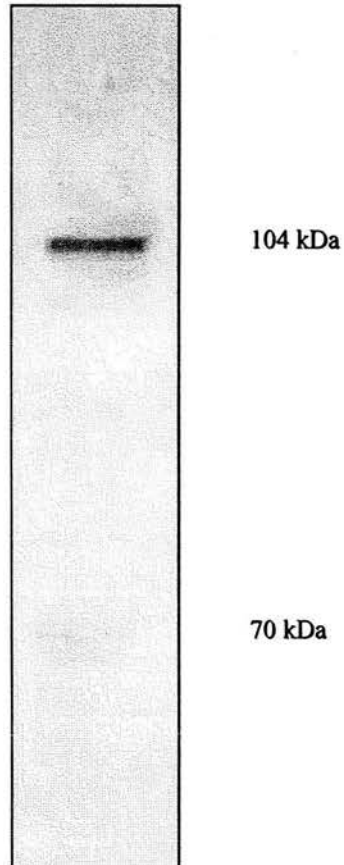


Figura 7. Inmunotransferencia del suero de conejo inmunizado con la leucotoxina de *M. haemolytica* purificada por electroelución y enfrentada a un sobrenadante de cultivo en fase de crecimiento logarítmico de *M. haemolytica*. Se observa una reacción fuerte en la zona de los 104 kDa y que corresponde a la zona hasta donde difunde la leucotoxina.

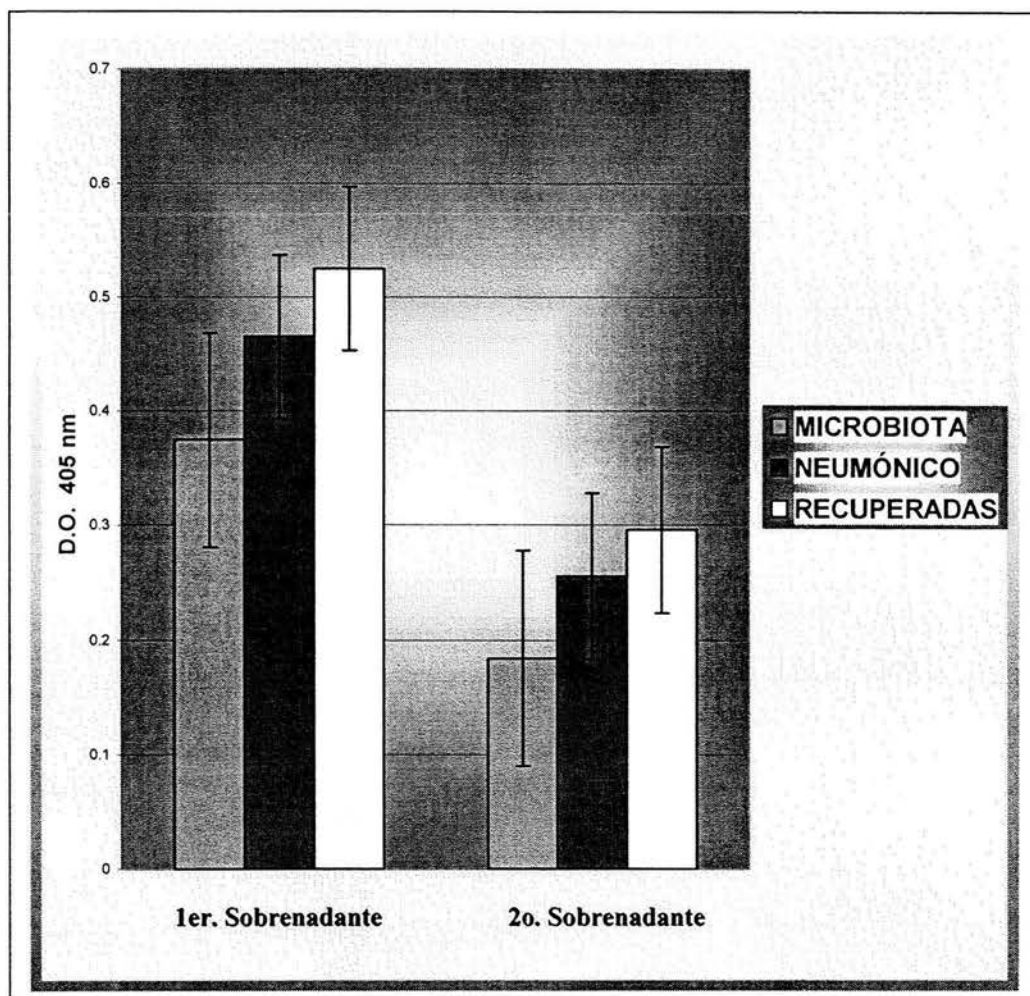
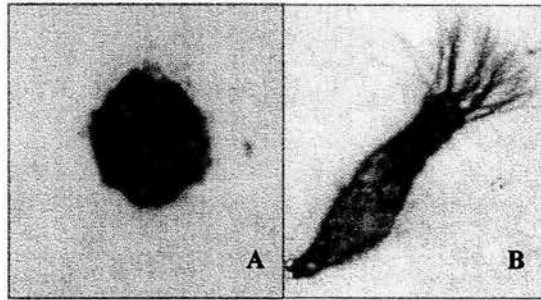


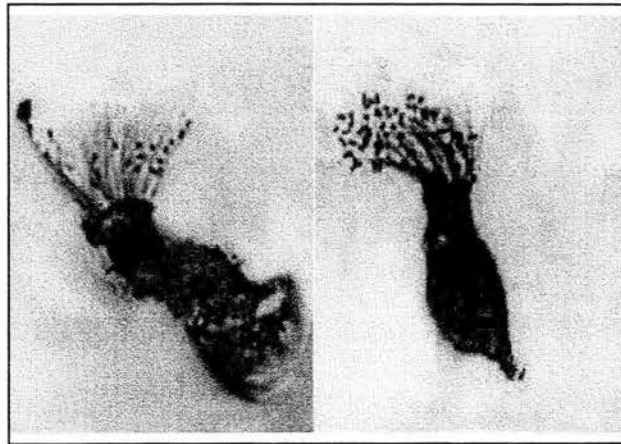
Figura 8. Capacidad de producción de leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* A2 de diferente origen. ELISA- indirecto. Para cepas de origen microbiota y neumónico n=15.



**Figura 9. Lavado bronquioalveolar para la obtención de macrófagos alveolares de corderos para la evaluación de adherencia de *M. haemolytica* A2.**



**Figura 10. Células obtenidas del lavado bronquial y del raspado traqueal de corderos. A: Macrófago alveolar. B: Célula del epitelio traqueal.**



**Figura 11. Adherencia de *M. haemolytica* a células del epitelio traqueal de corderos.**



**Figura 12. Adherencia de *M. haemolytica* a macrófagos alveolares.**



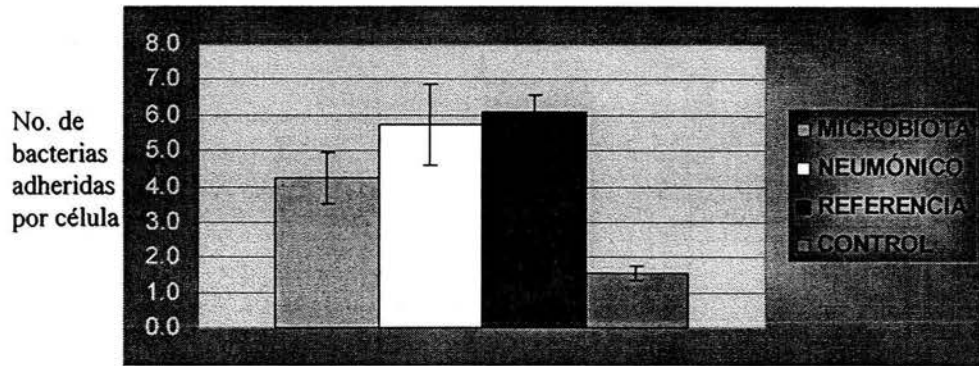


Fig 13. Adherencia de *Mannheimia haemolytica* A2 de diferente origen a células del epitelio traqueal.

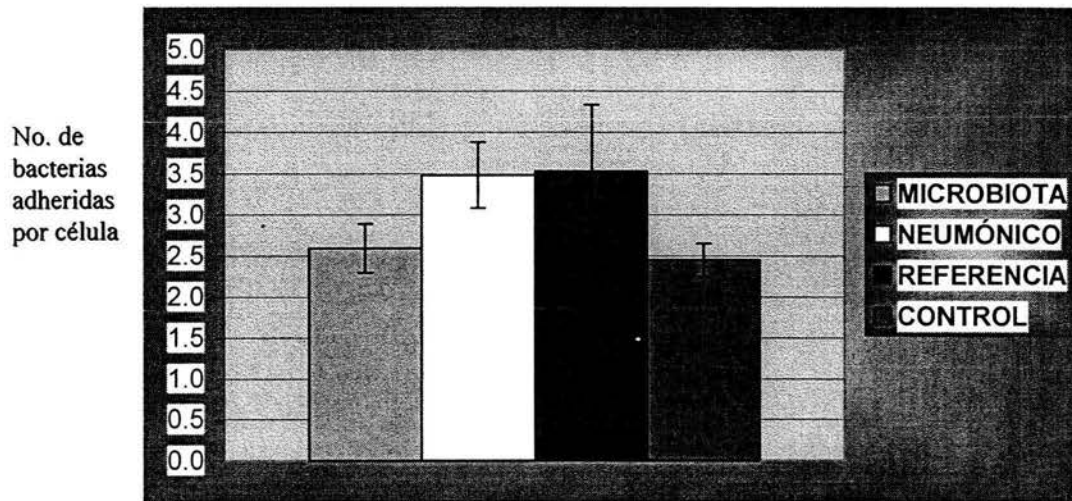


Fig 14. Adherencia de *Mannheimia haemolytica* A2 de diferente origen a macrófagos alveolares de corderos

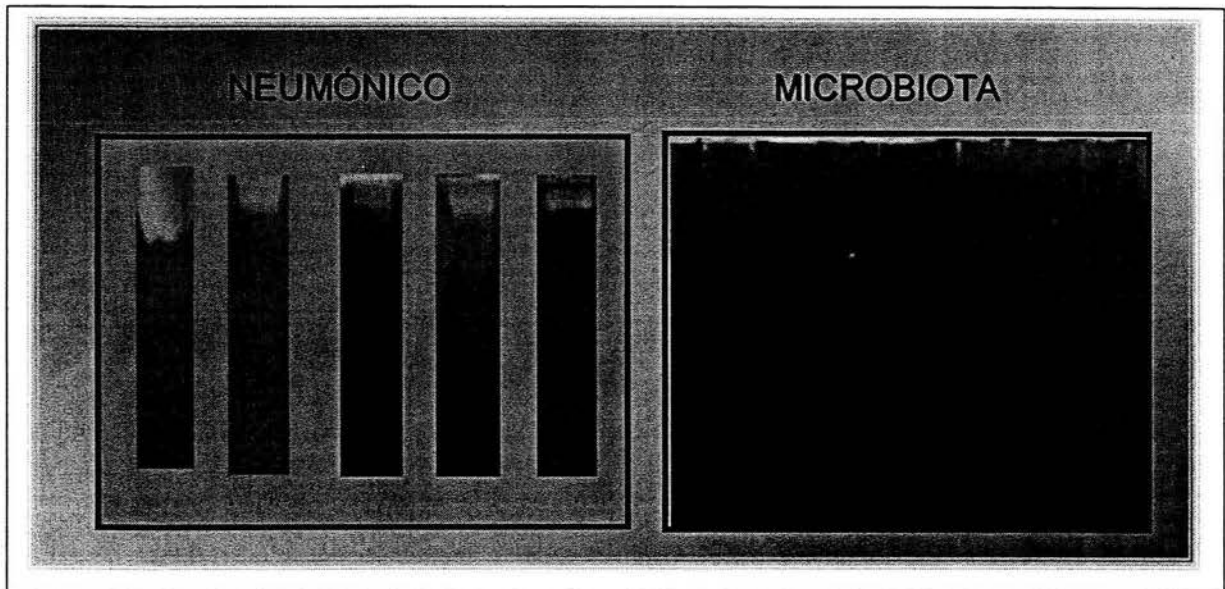


Figura 15. Actividad de proteasa en sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* A2 de diferente origen. En cada carril se muestra el efecto proteolítico de sobrenadantes distintos de cepas de origen neumónico y de microbiota. Cantidad de proteína por carril: 10  $\mu$ g

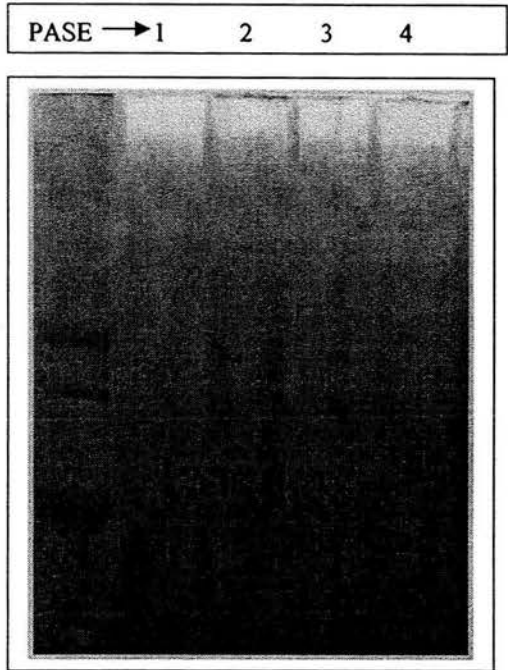


Figura 16. Carriles 1-4: Actividad de proteasa en sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* A2 después de varios pases *in vitro* de la bacteria. Cantidad de proteína por carril: 10 µg

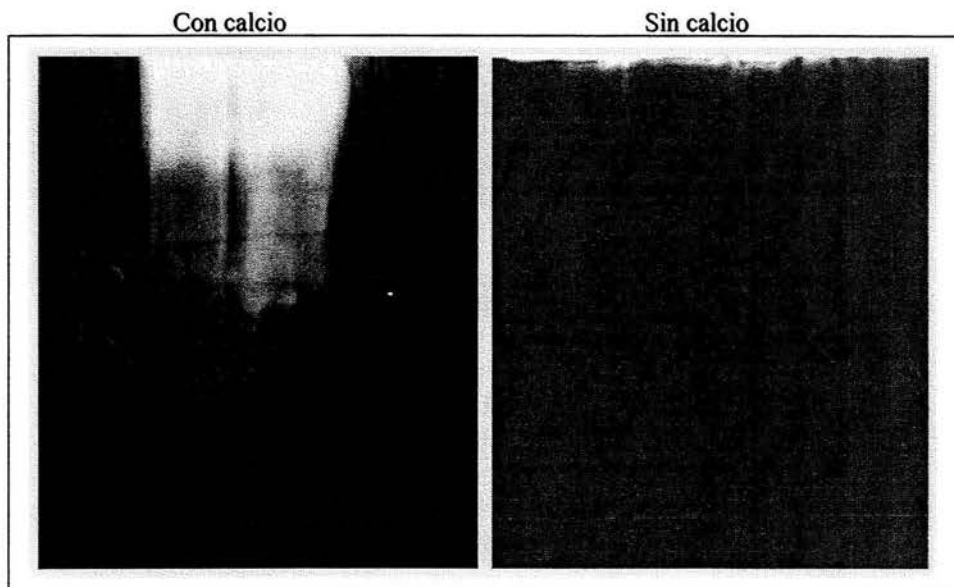


Figura 17. Actividad de proteasa en sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* A2 en presencia y ausencia de calcio. Cantidad de proteína por carril: 10 µg

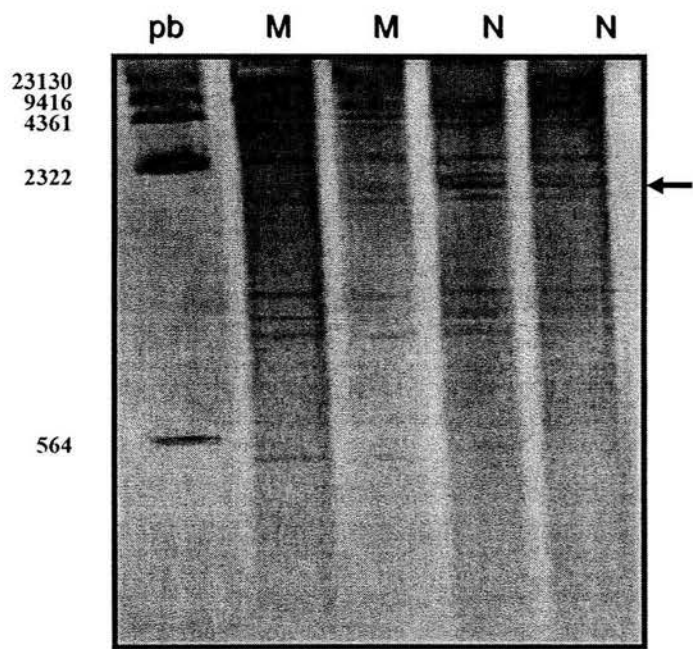


Fig. 18. Patrón de corte de la enzima *EcoR V* de aislamientos de origen diferente de *Mannheimia haemolytica* de corderos. Se observa una doble banda por debajo de la banda de 2322 pb en los aislamientos de origen neumónico (N) (carril 4 y 5). En los aislamientos de origen microbiota se observa sólo una banda (carril 2 y 3)

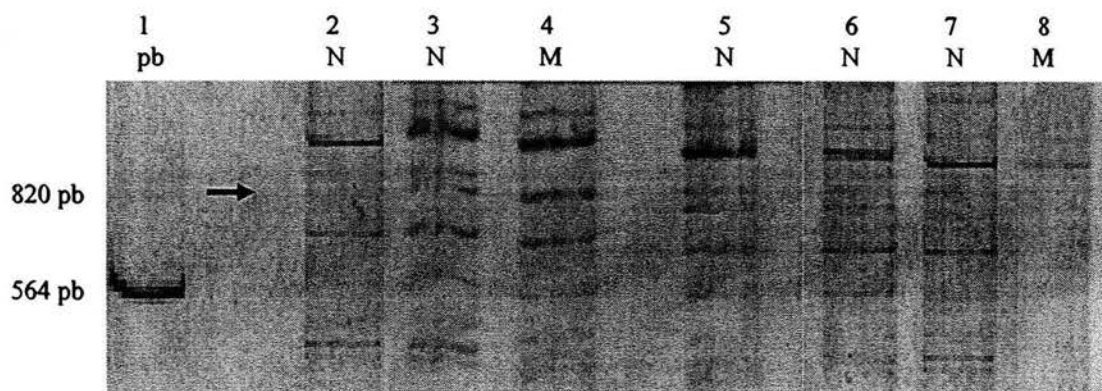
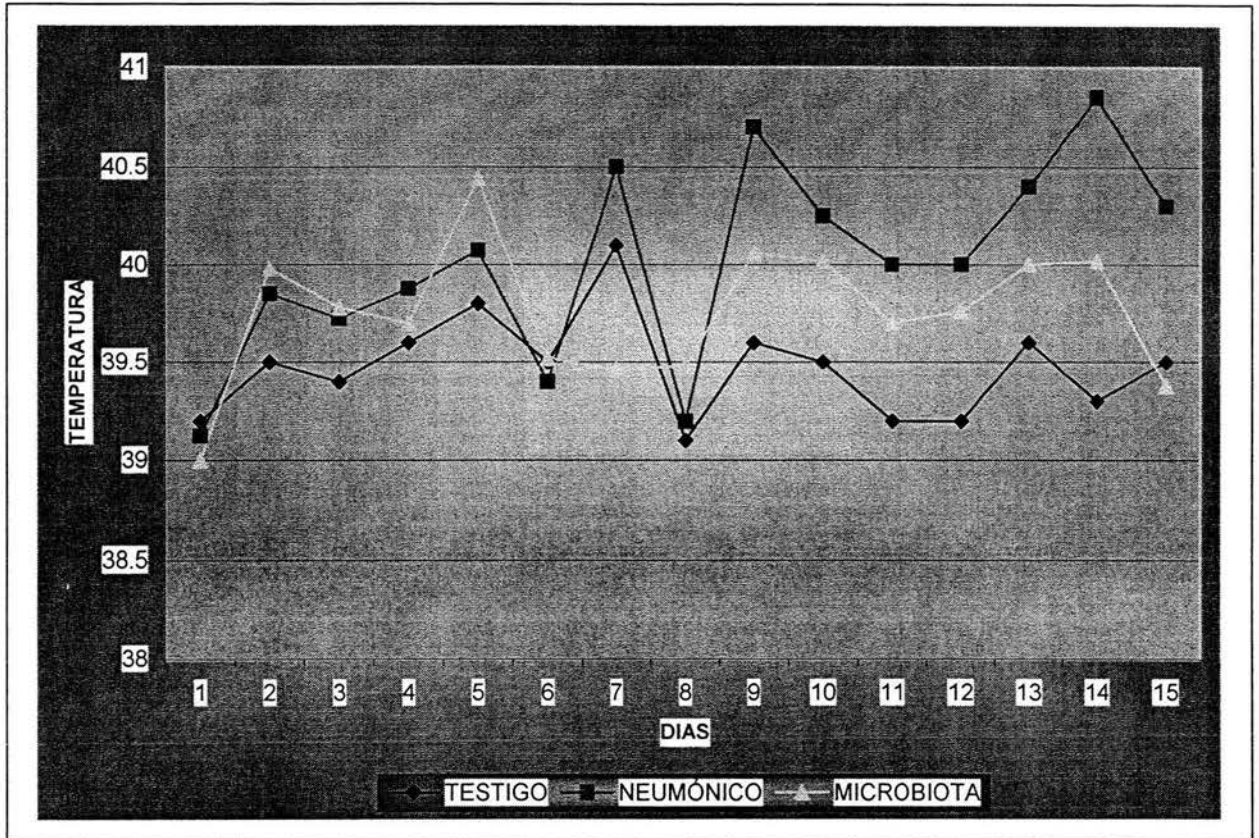


Fig. 19. Patrón de corte de la enzima *BamH* I de aislamientos de origen diferente de *Mannheimia haemolytica* de corderos. Nótese una doble banda por encima de la banda de 564 pb en los aislamientos de origen neumónico (N) (carril 2, 3, 5, 6 y 7). En los aislamientos de origen microbiota se observa sólo una banda (carril 4 y 8).



**Fig 20. Temperatura rectal en corderos desafiados con aislamientos de *Mannheimia haemolytica* A2 de diferente origen**

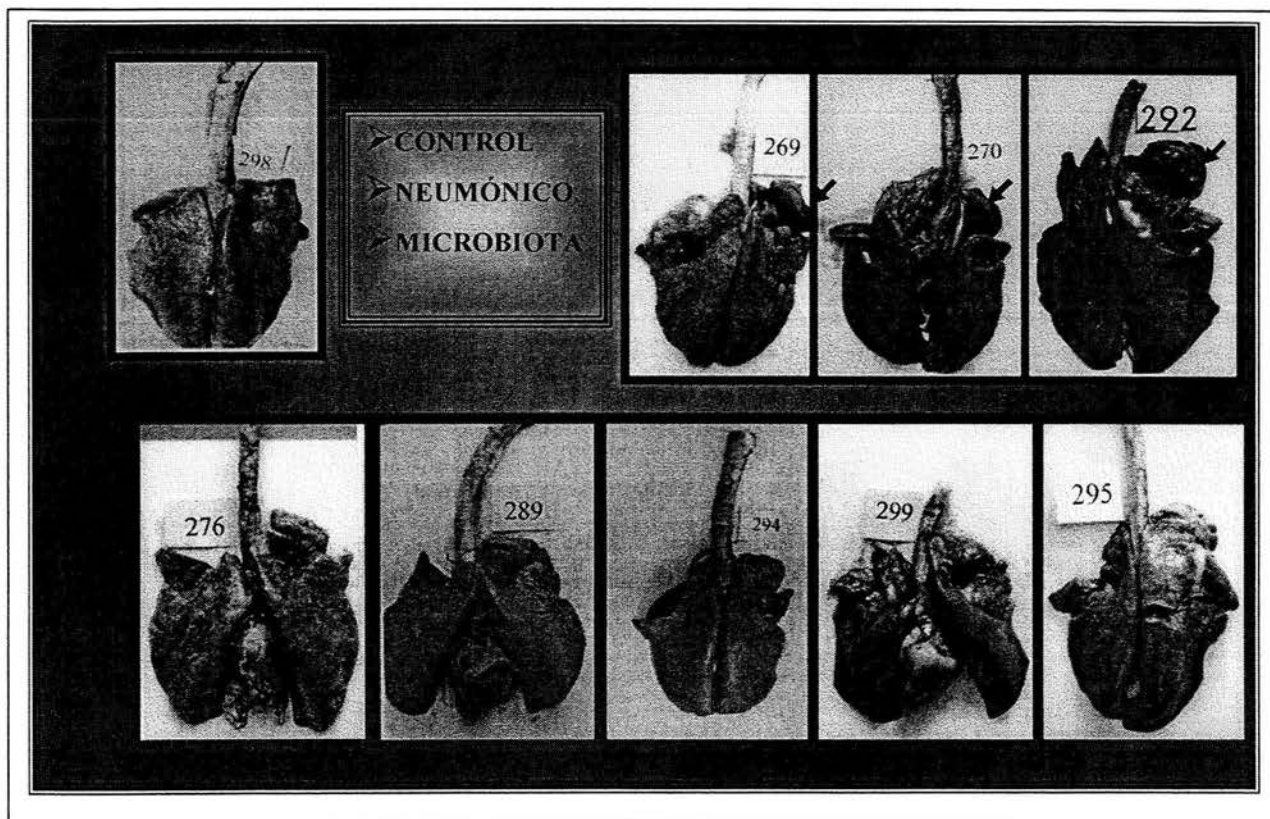


Fig 21. Lesiones en pulmón inducidas por la inoculación de *Mannheimia haemolytica* de diferente origen en corderos. Las flechas indican algunos sitios de lesión.

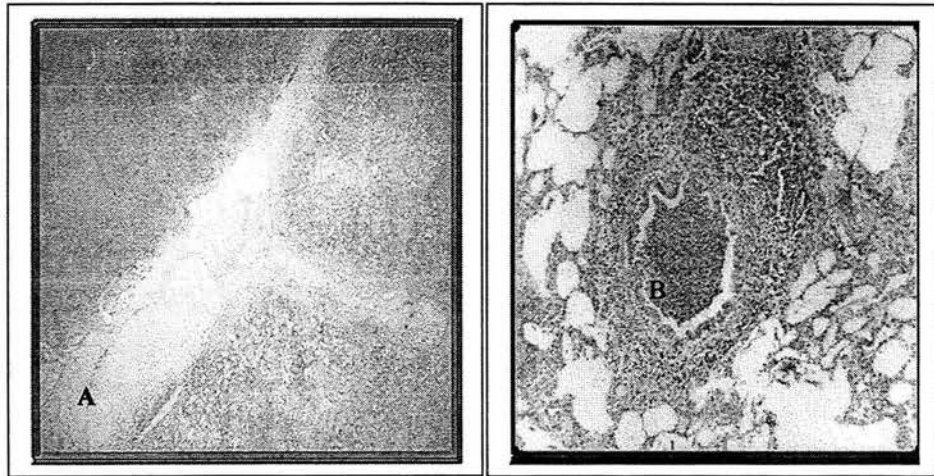
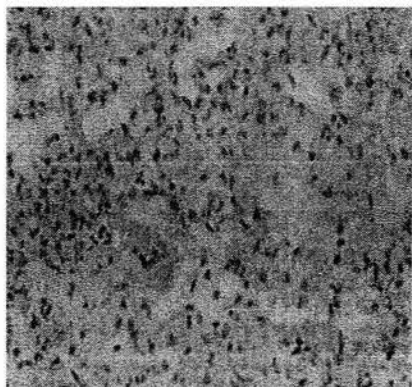
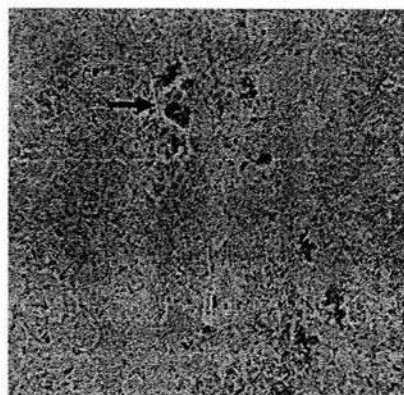


Fig 22. Lesiones histológicas en pulmón inducidas por la inoculación de *Mannheimia haemolytica* en corderos. A: Engrosamiento de los septos interlobulillares debido a la presencia de fibrina. B: Presencia de células inflamatorias en la luz bronquial

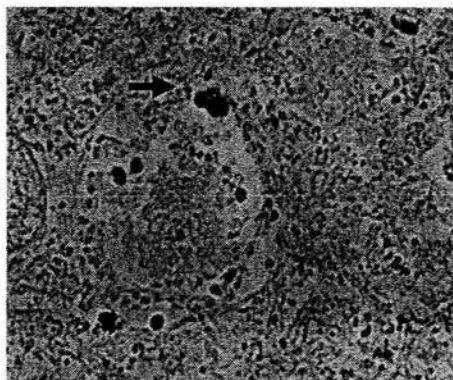




**Reacción negativa**



**Reacción positiva**



**Acercamiento de la reacción  
positiva**

Fig 23. Detección por inmunohistoquímica de la leucotoxina en pulmones de ovinos inoculados con *Mannheimia haemolytica* de diferente origen en corderos.

## V. DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas de salud que afectan a los ovinos jóvenes son los cuadros de neumonía. Uno de los agentes que se aísla con mayor frecuencia de estos procesos es *Mannheimia haemolytica*. Esta bacteria es parte de la microbiota normal de las vías respiratorias altas de animales sanos y además produce cuadros de intensidad variable que permiten suponer diferencias en patogenicidad entre aislamientos dependiendo de su origen. Por esta razón, el presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar los mecanismos de patogenicidad de *M. haemolytica* serotipo A2 aisladas de pulmones neumónicos y de cavidad nasal de corderos.

El porcentaje de recuperación de *M. haemolytica* a partir de pulmones neumónicos se considera bajo (32%), sin embargo, es conveniente señalar que los pulmones remitidos para el análisis bacteriológico provenían de animales que tenían diagnóstico clínico de neumonía. Al evaluar la condición de los pulmones, se determinó que muchos de ellos no presentaban lesiones neumónicas. Por otro lado, en algunos casos la neumonía se asoció a otros microorganismos como *Pasteurella multocida*, bacteria que puede considerarse responsable del proceso neumónico, sola o en asociación con *M. haemolytica*. También se debe considerar que por tratarse de unidades de producción, varios animales recibieron tratamiento con antibióticos, lo que influyó en el número bajo de aislamientos.

El serotipo que se aisló con mayor frecuencia, tanto a nivel cavidad nasal, como a partir de pulmones neumónicos, fue el A2. Este dato corresponde a lo mencionado por diversos autores,<sup>17,58,59</sup> que han demostrado que el serotipo más común en bovinos es el A1 y en ovinos es el A2. En el caso de los bovinos, también se ha aislado de manera frecuente a partir de nasofaringe el serotipo A2, sin embargo, estos aislados son aparentemente de patogenicidad baja.

La adherencia bacteriana es un factor de virulencia importante para muchas bacterias y en el caso de *M. haemolytica*, este es uno de los factores menos estudiados, en un trabajo realizado por Clarke y Morton,<sup>58</sup> se destacó la importancia de la adherencia de *M. haemolytica*, determinada mediante un método fluorométrico en forma comparativa la capacidad de adherencia que tenían dos serotipos de *M. haemolytica* en la línea celular MBDK y se demostró una mayor capacidad de adherencia del serotipo A1 respecto al A2. A pesar de que es mayor la frecuencia de aislamiento del serotipo A2 en las vías

respiratorias altas de los bovinos, este serotipo no es el más importante como causante de neumonía. Lo que implica que la patogenicidad de un serotipo podría no estar relacionada a su mayor capacidad de adherencia. En el presente trabajo, aunque no se hicieron comparaciones entre serotipos, si se realizaron entre aislamientos de diferente origen, encontrándose una capacidad de adherencia mayor para los aislamientos de origen neumónico.

Las estructuras bacterianas que participan en la adherencia incluyen fimbrias, adhesinas no fimbriales, adhesinas de naturaleza proteínica, parecidas a la cápsula, el glicocálix, el lipopolisácarido, los ácidos lipoteicóicos, las proteínas de membrana externa y la misma cápsula tiene capacidad para desempeñar esta función. En general, se asume que cualquier antígeno de la superficie bacteriana que tenga una conformación estereoquímica, perfil hidrofóbico y carga neta electrostática complementaria con las estructuras de membrana de su célula blanco, pueden funcionar como adhesinas.<sup>60</sup> Es posible que las diferencias en la capacidad de adherencia encontradas en este trabajo, sean debidas a la modificación o a la expresión de algunas de estas estructuras.

La presencia de una envoltura de polisacáridos extracelulares mejor conocida como glicocálix es frecuente en *M. haemolytica*, esta cubierta incrementa la resistencia de la bacteria a los mecanismos de fagocitosis, debido a su hidrofobicidad, carga y viscosidad; se considera que esta envoltura puede ser una extensión de los polisacáridos capsulares de la bacteria o de la cadena-O polisacárida. En un trabajo de Clark y Morton<sup>58</sup>, se observó que la capacidad de adherencia de *M. haemolytica*, asociada al glicocálix, se modifica de acuerdo a las condiciones de crecimiento de la bacteria. Es importante considerar que en nuestro trabajo, los sitios anatómicos y las condiciones micro ambientales, de donde provenían las cepas, eran diferentes, por lo que es posible encontrar diferencias en los factores que intervienen en la adherencia. Por otro lado, día con día se siguen identificando otros componentes relacionados con la adherencia de *M. haemolytica*, aunque su papel específico en la patogénesis del proceso apenas se empieza a analizar. Estas proteínas son de naturaleza proteínica y de peso molecular alto y tienen cierta homología con proteínas de otros agentes infecciosos donde si se ha demostrado su participación en la adherencia. El principal antígeno reconocido por estos autores tiene un peso molecular de 245 kDa y es similar, en masa, al antígeno de 240 kDa

de *Haemophilus influenzae*. No se sabe si este componente ya existía, o es parte de los procesos de modificación evolutiva de la bacteria para incrementar su patogenicidad<sup>61</sup>. Las similitudes entre microorganismos pueden explicarse en términos de evolución convergente o bien a la transmisión horizontal de material genético. Esto puede explicar de alguna manera los hallazgos observados en nuestro trabajo, donde es posible que la capacidad de adherencia diferente, tenga que ver con la presencia de ciertos antígenos.

En el caso de los macrófagos alveolares, se observó un número menor de bacterias adheridas a la superficie, comparado con las células del epitelio traqueal; esto puede ser debido a que los fenómenos de adherencia son más importantes en este último tipo de células en las fases tempranas de la infección, que permiten la proliferación y colonización de la bacteria. Como es bien sabido, la función del macrófago es la fagocitosis, así como el procesamiento y la presentación de antígenos. El hecho de haber observado menos bacterias adheridas, puede explicarse a que debido al tiempo de incubación, las bacterias que se adhirieron fueron internalizadas y posiblemente degradadas. También es posible que no existiera afinidad de la bacteria por el macrófago, porque las bacterias se adhieren a la superficie epitelial vía receptores específicos y los factores bacterianos involucrados en las interacciones bacteria-célula son diversos. La expresión o represión de los diferentes mecanismos de adherencia bacteriana, están regulados aparentemente, por las condiciones microambientales y por la superficie celular dentro del mismo hospedero. En su forma más simple, la adherencia microbiana requiere la participación de una adhesina y su receptor, las interacciones que se establecen entre estos componentes son el resultado de enlaces complementarios específicos que permiten a la bacteria adherirse y evitar algunos mecanismos de defensa del hospedero.<sup>62</sup>

Los receptores mejor conocidos son las cadenas oligosacáridicas de glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular. Los más importantes son las glicoproteínas, que además de localizarse en la superficie de la membrana, se secretan dentro del moco que cubre el epitelio mucosal de los tractos digestivo y respiratorio. Es muy posible que estos receptores estén en muy baja cantidad en los macrófagos y de ahí la baja actividad adherente de las bacterias observada en el presente estudio, porque los sistemas de reconocimiento de partículas o microorganismos a fagocitar, en la mayoría de los casos, está mediado por mecanismos inmunes.<sup>63</sup>

En términos generales se observó una buena capacidad de adherencia de *M. haemolytica* a las células del epitelio traqueal, aparentemente mejor a la observada en macrófagos alveolares, esto puede ser debido a la afinidad que tiene esta bacteria por este tipo de células que pertenecen a un hábitat natural similar al que se adapta fácilmente *M. haemolytica*. Un ejemplo de la afinidad alta que tiene el género *Pasteurella* por células epiteliales, se detalla en el trabajo realizado por González *et al.*<sup>64</sup> Estos autores describieron los daños ocasionados por *P. multocida* en el epitelio mucociliar de cerdos inoculados experimentalmente. Con ayuda del microscopio electrónico de barrido, observaron una destrucción casi total del epitelio mucociliar, además de un número importante de bacterias adheridas a este epitelio; los daños fueron más severos en aquellos cerdos donde *Mycoplasma hyopneumoniae* actuaba de manera sinérgica.

Algunas bacterias Gram (-) son capaces de variar la composición de su lipopolisacárido (LPS), con el objeto de evadir las respuestas del huésped y hacerse patógenas, además de poder constituir un paso importante para la transformación de comensal a patógeno. Estas variaciones en el LPS han sido demostradas para *Mannheimia haemolytica*. Mediante un análisis electroforético y de inmunotransferencia se analizaron 58 aislamientos de *M. haemolytica* obtenidos de la nasofaringe de ovinos clínicamente sanos. Se determinaron cuatro perfiles diferentes en el LPS. Uno de los serotipos más frecuentes en este estudio fue el A2 (53%) destacando la alta variación en su LPS debido a que mostró tres de los cuatro perfiles descritos. El perfil más frecuente mostró un patrón de tres bandas.<sup>65</sup> Aunque el LPS no es el compuesto más importante que se asocia a la adherencia bacteriana, la variación en su estructura, si podría participar en la capacidad diferente de adhesión de la bacteria, o bien, en la mayor capacidad de algunas cepas para reproducir el cuadro neumónico observada en el presente trabajo.

Es evidente que existe una gran variedad de factores que sustentan la variabilidad de los microorganismos en sus características fenotípicas, aún intraespecies. En nuestro trabajo estas diferencias fueron muy evidentes en las características evaluadas; quizá una de las más importantes o en la que se ven reflejadas la mayoría de ellas, fue la patogenicidad distinta observada en las cepas. Un factor de variabilidad lo constituye la expresión de determinados antígenos dependiente de las condiciones que se dan en un proceso neumónico. Las condiciones de crecimiento *in vivo*, son un factor determinante

en esta expresión, la cantidad de antígenos reconocidos puede variar en animales con grado diferente de resistencia a un proceso neumónico, como lo demostraron Mosier, *et al.*<sup>66</sup> y Confer y Durham.<sup>67</sup> En estos trabajos se determinaron, por reconocimiento inmune, cuatro antígenos inmunodominantes en diferentes grupos de animales, destacando un antígeno de 100 y otro de 16 kDa que fueron reconocidos por animales resistentes al proceso neumónico. El antígeno de 100 kDa podría corresponder a la leucotoxina de *M. haemolytica*, aunque existe controversia y podría ser un nuevo antígeno de la bacteria, potencialmente importante.<sup>68</sup>

Esta variación antigénica también fue observada por Brodgen y Clarke,<sup>69</sup> quienes demostraron variaciones en la superficie de *M. haemolytica* (glicocálix) inducidos por factores medio-ambientales. En cámaras subcutáneas colocadas en bovinos fueron inoculadas bacterias vivas, las cuales aumentaron hasta 0.5  $\mu$ M el grosor de su glicocálix. En este mismo trabajo, también se analizó el perfil de aglutinación con 17 lectinas diferentes, mostrando analogía en 10 de las 17 lectinas, lo que permite demostrar cambios importantes en la superficie bacteriana inducidos por las condiciones microambientales *in vivo*.

Las diferencias observadas en el ADN de *M. haemolytica* de diferente origen en el perfil de corte con endonucleasas de restricción y que podrían estar asociadas a la mayor patogenicidad de las cepas de origen neumónico observada en nuestro trabajo, pueden sustentarse en el hecho de que es posible encontrar cepas mutantes deficientes en la producción de leucotoxina que pierden de manera considerable su capacidad patogénica.<sup>70</sup> Odendaal y Plessies,<sup>71</sup> demostraron diferencias entre dos cepas en la capacidad de producción de leucotoxina. Encontraron además, que dos cepas de *M. haemolytica* tenían dos picos máximos diferentes de producción de leucotoxina. Estos ensayos fueron realizados tomando cada hora, alícuotas de sobrenadantes de cultivo en medio RPMI-1640 con diferentes aditivos, albúmina sérica bovina y suero fetal bovino. No se observaron diferencias de producción entre aditivos, pero sí entre cepas. En el presente estudio, las cepas que se utilizaron para los ensayos de desafío, eran aquellas que habían demostrado su mayor capacidad de adhesión, de producción de leucotoxina y de producción de proteasas de secreción; aunque es difícil demostrar cual propiedad patogénica es la más importante, éstas pueden estar relacionadas directamente con la

variación genética de las cepas evaluadas. En otro estudio, también se demuestra la variación fenotípica asociada a la genotípica, se menciona que aunque la mayoría de los cuadros neumónicos en bovinos y ovinos son muy similares; existen varias subpoblaciones de *M. haemolytica* genéticamente distintas, que se adaptan a ovinos o bovinos.<sup>72</sup> Estas variaciones fueron determinadas por el análisis de la variación alélica de locus codificantes de 18 enzimas (multi-locus). Los aislamientos obtenidos de bovinos y ovinos formaron 2 grupos, 22 tipos electroforéticos y tres líneas importantes. La primera línea estuvo representada por el serotipo A2 obtenido de ovinos; la segunda línea por el serotipo A2 aislado de bovinos, junto con los serotipos A7 y A13; la tercera, por los serotipos restantes. También es importante señalar que este estudio demuestra la relación evolutiva que han sufrido estos aislamientos de *M. haemolytica*, sugiriendo que el hospedador ancestral es el ovino y que a partir de aquí, se ha derivado una variedad amplia de clonas que se han adaptado a otras especies como el bovino. La especificidad de hospedero, bovino u ovino y la virulencia, al parecer están determinadas por el perfil de proteínas de membrana externa. Incluso esta variación genética ha dado lugar en algunos casos a procesos de reclasificación de esta bacteria, por ejemplo, el serotipo A 11 de *Pasteurella haemolytica* ahora es reconocido como *M. glucosida*. Esta última comprende actualmente a un grupo de bacterias heterogeneas de patogenicidad baja consideradas agentes oportunistas en ovinos.<sup>7</sup>

Las diferencias que se pueden encontrar en el ADN de una bacteria pueden ser inducidas de manera natural o por intervención del hombre en el caso de la construcción de mutantes. Como ejemplo se tiene la evolución molecular que ha sufrido el operón lktCABD que codifica la leucotoxina de *M. haemolytica*. Davies *et al.*,<sup>73</sup> estudiaron esta evolución y demostraron que el operón tiene una estructura de mosaico compleja que ha resultado de eventos de recombinación de ADN inter e intraespecie. De todos los segmentos, el lktD es el más conservado, en tanto el lktA, lktB y lktC contienen una gran variedad de segmentos de recombinación provenientes del serotipo A2 de *M. haemolytica*. Estas recombinaciones en el operón de la leucotoxina pueden darle a la bacteria características que le ayuden a evadir la respuesta inmune del animal por simples variaciones antigénicas. Es posible que las bandas adicionales observadas en este trabajo, al digerir el ADN con las enzimas de restricción, tengan que ver con los cambios

evolutivos que ha sufrido la bacteria, o ser simplemente cambios temporales relacionados con las condiciones microambientales de los sitios anatómicos de donde fueron recuperadas.

Otro ejemplo de manipulación del ADN de *M. haemolytica* y que tiene que ver con la capacidad de producción de leucotoxina, fue el trabajo realizado por Fedorova y Highlander,<sup>74</sup> quienes realizaron inserciones dirigidas de genes no polares y fusiones de operones para crear una cepa que produce y secreta una leucotoxina que no es tóxica ni hemolítica. En este proceso se realizó una copia del gen *lktC* el cual fue inactivado por inserción de un cassette no polar y posteriormente colocado en un vector para ser introducido a *M. haemolytica*.

Este tipo de manipulaciones permite deducir la existencia de cambios que ocurren de manera natural en las bacterias, que les provocan cambios en sus características fenotípicas, y en donde por supuesto la capacidad patogénica diferente es una de las más importantes.

En el presente trabajo, se observaron diferencias genotípicas, que aunque no se determina si inducen cambios fenotípicos específicos, si se encuentran asociados con capacidad patogénica diferente. Otros autores,<sup>75</sup> han encontrado variaciones fenotípicas entre aislamientos de *M. haemolytica*, aunque tampoco las han relacionado con variaciones en el genoma de la bacteria. Sin embargo, estas variantes indujeron procesos patológicos distintos. Esos aislamientos se obtuvieron a partir de cuadros neumónicos, de mastitis, otitis media e incluso de encefalitis. Las principales diferencias fenotípicas detectadas en estos aislamientos estaban relacionadas con la producción de ácido a partir de diferentes azúcares, e incluso con la producción de indol, que es una de las características principales asociadas a *M. haemolytica*.

En relación al perfil de corte con endonucleasas de restricción, éste se ha utilizado para determinar diferencias entre cepas con fines epidemiológicos.<sup>76</sup> De Rosa *et. al.*<sup>77</sup> realizaron un estudio comparativo entre aislamientos de *Pasteurella spp* obtenidos de cavidad nasal y de traquea en bovinos que presentaron enfermedad respiratoria. El análisis lo realizaron comparando cada par de aislamientos obtenidos de un mismo animal. La comparación se realizó mediante el perfil de corte con endonucleasas de restricción y posterior ribotipificación. Estos autores observaron una similitud



bacteriológica del 96% de los pares aislados. Sin embargo, a la ribotipificación encontraron el 70% de similitud. Se observaron seis ribotipos diferentes, de los cuales 2 fueron predominantes. Paralelamente, determinaron resistencia a antibióticos encontrando una susceptibilidad similar para cetiofur, eritromicina, tilmicosin, trimetropin-sulfametoxazol y florfenicol; así como variaciones menores para ampicilina y estreptomina. Estos resultados demuestran diferencias genéticas importantes entre aislamientos relacionadas con el sitio de origen y están parcialmente de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, estas diferencias genéticas observadas en ambos estudios, no se han relacionado de manera directa con mayor o menor capacidad de virulencia. También es posible que en un análisis de ribotipificación, la variabilidad de nuestras cepas hubiese sido mayor, debido a que el origen era distinto en cuanto a sitio anatómico y a las condiciones de los animales de donde se obtuvieron las muestras.

Desde 1993, ya se habían empezado a demostrar diferencias entre aislamientos de *M. haemolytica*. Scanlan *et al.*<sup>78</sup> describieron diferencias importantes entre aislamientos de *M. haemolytica* del serotipo A2, obtenidos de la cavidad nasal de cabras. Estos autores determinaron la susceptibilidad a 12 antibióticos y el perfil enzimático de cada aislamiento contra 19 sustratos distintos. Los resultados más importantes revelaron siete diferentes perfiles enzimáticos y ocho perfiles diferentes de susceptibilidad antimicrobiana. Los datos de esa investigación demuestran la característica heteróloga de los aislamientos de *M. haemolytica* obtenida de cavidad nasal. Aunque la susceptibilidad antimicrobiana, en la mayoría de los casos, está regida por la transmisión de material genético extracromosómico proveniente de otras bacterias,<sup>17</sup> las características enzimáticas de cada aislamiento podrían estar asociadas a cambios en el material genético, inducidos por las condiciones microambientales externas de la bacteria. Estos resultados, también están de acuerdo de forma parcial con los obtenidos en el presente trabajo, donde se determina claramente la diferencia que existe entre aislamientos de origen distinto en otras características, pero también son observables diferencias, aunque menos intensas, entre aislamientos del mismo origen.

El efecto sinérgico de la combinación virus-bacteria en la producción de neumonía ha sido estudiado por años. En uno de los más recientes trabajos realizado con bovinos,

se demuestra este efecto entre el Herpesvirus bovino-1 y *M. haemolytica*. Las lesiones mas severas observadas suceden cuando existe la combinación de estos dos agentes, comparadas a aquellas donde se utilizan de manera separada. En este estudio realizado por Narita *et. al.*<sup>79</sup> se realizaron análisis de histopatología e inmunohistoquímica. Destaca la presencia de antígenos de *M. haemolytica* alrededor de los focos de necrosis y dentro de los macrófagos alveolares, sin embargo no se describe qué tipo de antígenos se están detectando, debido a que utilizan como primer anticuerpo un antisuero desarrollado en conejos, sin mencionar el tipo de material inoculado. El antígeno detectado por estos autores, puede ser la bacteria completa fagocitada o bien asociada a los procesos necróticos. En el presente trabajo, en cambio, el antígeno se detectó en el tejido linfoide asociado a bronquios y su localización es intracelular, lo que refuerza la idea de que el antígeno evaluado era efectivamente la leucotoxina de *M. haemolytica*.

En el trabajo de Narita *et. al.*<sup>79</sup> las lesiones patológicas, aunque diferían entre grupos, fueron muy similares en lo general a las causadas por la bacteria sola o en asociación con agentes virales; destacan la bronquitis y bronquiolitis necrosante, pleuritis fibrinosa, distensión de septos interlobulillares por trombosis de vasos linfáticos, necrosis coagulativa, cuerpos de inclusión de localización intranuclear y exudación de células polimorfonucleares en espacios aéreos. Lesiones muy similares fueron observadas en nuestro trabajo, con excepción de los cuerpos de inclusión que en este caso no se observaron, aunque ocurren en las infecciones del PI<sub>3</sub> con localización intracitoplasmática.

En relación a la producción de proteasas de secreción, a éstas no se les ha prestado mucha atención, se ha descrito la presencia de una proteasa similar a la descrita por nosotros en sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* que tiene efecto sobre inmunoglobulina G<sub>7</sub>.<sup>48</sup> Sin embargo, su importancia en la patogenia de la neumonía no ha sido determinada. Así mismo, en la información consultada a la fecha, no se ha publicado más información al respecto. Por otro lado, se han descrito otras proteasas: una metaloproteasa conocida como sialoglicoproteasa y una neuraminidasa, las cuales posiblemente juegan un papel importante en la adherencia bacteriana.<sup>80</sup> Sin embargo, las proteasas encontradas en este trabajo podrían tener funciones diferentes, a pesar de ser también metaloproteasas por su dependencia de calcio. En bacterias genéticamente relacionadas, como *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, se han descrito

proteasas de secreción con características similares a las observadas para *M. haemolytica*. Son proteasas de alto peso molecular (arriba de 200 kDa) y degradan gelatina porcina, hemoglobina e inmunoglobulina A.<sup>81</sup> Esta última característica, le permitiría al agente evadir uno de los principales mecanismos de defensa a nivel de mucosas. A pesar de que a las proteasas de *M. haemolytica* no se les ha determinado esta última característica, su presencia se encontró asociada a bacterias con aparente mayor patogenicidad. Un porcentaje alto de aislamientos de origen neumónico presentaron esta producción de proteasas. El hecho de que algunos aislamientos no presentaron esta característica, pudo deberse a que en un proceso activo, pueden encontrarse de manera combinada bacterias de patogenicidad alta y baja, con o sin esta capacidad de producción.

El presente trabajo destaca la importancia de la leucotoxina de *M. haemolytica* y su participación en la patogénesis de la enfermedad, en principio, por la capacidad de producción diferente entre aislamientos, sobre todo en aquellos asociados a cuadros neumónicos. También por su presencia en los tejidos de animales inoculados de manera experimental, donde se observó su localización intracelular y en cantidades altas en el tejido linfoide asociado a bronquios. Fue evidente su producción alta en la fase de crecimiento logarítmico como ha sido descrito por varios autores.<sup>9,10,11</sup>

Se realizó un primer ensayo para determinar la capacidad de producción de leucotoxina por parte de los diferentes aislamientos utilizando un ensayo visual simple. Por ser visual, este método es de baja sensibilidad, pero permitió observar diferencias en dicha capacidad.

La leucotoxina de *M. haemolytica* es uno de los antígenos más estudiados de esta bacteria y el que más ha sido asociado a la patogénesis de la enfermedad. De los descubrimientos más recientes, destaca la presencia de un antígeno en la superficie de los leucocitos de rumiantes, conocido como integrina  $\beta(2)$  CD11a/CD18 (LEA-1), que al unirse con la leucotoxina de *M. haemolytica* induce la activación del leucocito y la subsecuente citólisis. Las infecciones virales primarias pueden inducir la expresión mayor de este antígeno, siendo un mecanismo que soporta la interacción virus-bacteria que conlleva a la mayor severidad de las neumonías.<sup>82,83</sup> Se ha reconocido que el marcador de superficie CD18 perteneciente a la integrina  $\beta(2)$  CD11a/CD18 (LEA-1), es necesario y

suficiente para mediar la citólisis ocasionada por la leucotoxina de *M. haemolytica*.<sup>84</sup> Asimismo, las citocinas inflamatorias que se observan en infecciones virales y bacterianas, pueden inducir también la expresión de este antígeno, provocando la formación de estructuras similares a poros en la membrana, lo cual induce la lisis de leucocitos. En esta lisis pueden involucrarse mecanismos de apoptosis y necrosis. Las citocinas que han mostrado tener este efecto son la IL-1 $\beta$ , el Factor de necrosis tumoral alfa y el interferón gama.<sup>85</sup>

Aparte de los mecanismos de apoptosis, la leucotoxina también provoca muerte celular por oncosis. El mecanismo de oncosis, a diferencia de la apoptosis, induce pocos cambios nucleares, liberación de contenido citoplásmico que se acumula alrededor del tejido e inflamación.<sup>86</sup>

La especificidad de la leucotoxina también ha sido determinada; en un estudio reciente se observó además de una unión específica de la leucotoxina con leucocitos de rumiantes, la interacción con leucocitos de cerdo. Sin embargo, esta unión no provocó daño ni lisis celular a pesar del ingreso de calcio al interior de la célula. En leucocitos de equino y perro no existió esta interacción.<sup>87</sup>

Se han mencionado propiedades patogénicas distintas en los diferentes aislamientos obtenidos en nuestro trabajo, sin embargo, hay que considerar los factores asociados al animal que permitan la inducción del daño por parte de la bacteria a los tejidos. Por ejemplo, la presencia o ausencia de receptores específicos para la leucotoxina de *M. haemolytica*, mencionados anteriormente; la participación de selectinas que se expresan en neutrófilos, que juegan un papel determinante en la susceptibilidad de estas células a la leucotoxina de *M. haemolytica*, ya que después de la activación de los neutrófilos, las L-selectinas son destruidas en la membrana del neutrófilo por enzimas proteolíticas, permitiendo la expresión de las  $\beta$ -integrinas (c/CD18 [LFA-1]), responsables de la especificidad de la leucotoxina a estas células.<sup>88</sup> La inhibición de estas selectinas disminuye la infiltración de neutrófilos durante las fases agudas de la neumonía causada por *M. haemolytica*.<sup>89</sup> Este fenómeno disminuiría la severidad del daño pulmonar, porque como es bien conocido, el daño tisular se produce por factores bacterianos y factores propios del animal; la respuesta inflamatoria provocada por neutrófilos es el principal

factor, al liberar una gran cantidad de mediadores que inducen el daño. Entre estos mediadores destacan la IL-1 $\beta$  y la IL-8 que son producidos por los neutrófilos.<sup>38</sup>

La velocidad de crecimiento relacionada con virulencia es un factor al que se le presta poca atención. En este trabajo fue evidente la diferente velocidad de crecimiento de los aislamientos (datos no mostrados) en condiciones similares de crecimiento. La mayor velocidad de crecimiento fue para los aislamientos de origen neumónico. Esta observación se realizó cuando se hizo la evaluación de la capacidad de producción de leucotoxina donde las condiciones eran bien controladas y estandarizadas.

En el presente trabajo son claras, aunque no absolutas, las diferencias entre aislamientos de acuerdo a su origen; en su capacidad de producción de leucotoxina, proteasas de secreción y el patrón de corte con endonucleasas de restricción, entre otras. Aunque no fue posible determinar qué propiedad patogénica era la más importante y la responsable de inducir el mayor daño, se puede presumir que una o más propiedades patogénicas de la bacteria, son las responsables de provocar trastornos severos en el pulmón del animal enfermo. También es posible que las cepas aisladas de cavidad nasal tengan una patogenicidad similar a las de origen neumónico y que de alguna manera el sistema inmune las mantenga controladas, esto basado en el hecho de que algunas cepas de origen microbiota tuvieron un comportamiento similar a las de origen neumónico.

Este fenómeno de interacción entre propiedades patogénicas, ha sido estudiado. Lafleur *et. al.*<sup>90</sup> demostraron el efecto sinérgico que existe entre el lipopolisacárido y la leucotoxina de *M. haemolytica* sobre macrófagos alveolares de bovinos. En ese estudio se caracterizó el efecto de la exposición simultánea de LPS y leucotoxina sobre la citólisis y la producción de citocinas proinflamatorias del macrófago alveolar. Para determinar citólisis se utilizó la liberación de lactato deshidrogenasa como método indirecto. Se encontró que dosis de 80 a 200 pg/ml de LPS no induce citólisis por sí mismas, aunque incrementaron de manera sinérgica la destrucción de macrófagos de 2 a 5 unidades/ml de leucotoxina. Así mismo, por inmunotransferencia se demostró el efecto sinérgico de estos dos compuestos al observarse un incremento en la producción del mRNA-IL8 y los patrones cinéticos de  $\alpha$ -FNT e mRNA-IL8 comparados con la producción de éstos por el efecto separado de LPS y leucotoxina.

Por último, investigaciones futuras deberían estar encaminadas a determinar la participación exacta de estos factores en la patogénesis de la enfermedad y evaluar su utilización como inmunógenos presentes en los biológicos para la prevención de la neumonía ocasionada por *Mannheimia haemolytica*.

## VI. CONCLUSIONES.

- Se confirmó que el serotipo más frecuente de *Mannheimia haemolytica* en ovinos de México es el serotipo A2, como habitante normal de la cavidad nasal y como agente principal asociado a neumonías en corderos.
- *Pasteurella multocida* se aísla con menor frecuencia en ambos casos también.
- Las propiedades patogénicas de los aislamientos de *Mannheimia haemolytica* obtenidos a partir de pulmones neumónicos son mayores, comparadas con aquéllas obtenidas de la cavidad nasal de los corderos. Esto demostrado por la mayor capacidad de producción de leucotoxina *in vitro*, sus mejores propiedades adherentes a células del epitelio traqueal, a su mayor capacidad de producción de proteasas de secreción y a la capacidad de reproducir el cuadro neumónico en un modelo de desafío en corderos.
- Fue posible determinar diferencias en el perfil de corte con endonucleasas de restricción, entre aislamientos de origen neumónico y de cavidad nasal. Esto podría indicar diferencias genotípicas que pudiesen estar relacionadas con características fenotípicas de las bacterias y probablemente asociadas con patogenicidad.
- Se confirmó la participación de la leucotoxina en el proceso neumónico, al ser detectada por métodos inmunohistoquímicos en el pulmón con lesiones de neumonía en corderos inoculados de manera experimental. Esta leucotoxina se observó de manera frecuente asociada a células.

## VII. LITERATURA CITADA.

- 1.- Martin SW, Meek AH, Davis DG, Thomson RG, Johnson JA, Lopez A, Stephe L, Curtis RA, Prescott A. Factors associated with mortality in feedlot cattle. The Bruce country beef project. *Can J. Comp. Med.* 1980; **44**: 1.
- 2.- Confer AW, Panciera RJ, Gentry MJ, Fulton RW. Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 1986; **47**:1853.
- 3.- Confer AW, Panciera RJ, Mosier DA. Immunity to *Pasteurella haemolytica*. *J.A.V.M.A.* 1985; **193**:1308-1316
- 4.- Frank GH, Wessman GE. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 1978; **7**: 142-145 .
- 5.- Biberstein EL. 1978. Biotyping and Serotyping of *Pasteurella haemolytica*. En: Norris BT. *Methods in Microbiology*. Neew York Academic Press Inc., **10**:253
- 6.- Sutherland AD, Redmond J.. Cytotoxin from ovine strain of *Pasteurella haemolytica* : Characterization studies and partial purification. *Vet. Microbiol.* 1986; **11**: 33
- 7.- Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M.. Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov., and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999; **49**: 67-86.
- 8.- Berggren KA, Baluyut CS, Simonson RR, Berrick WJ, Maheswaran SK. Cytotoxic effect of *Pasteurella haemolytica* on ovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 1981; **42**: 1383
- 9.- Himmel ME, Yates MD, Laverman LR, Squire PG. Purification and partial characterization of a macrophage citotoxin from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 1982; **43**: 764.
- 10.- Shewen PE, Wilkie BN. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.* 1982; **35**: 91.
- 11.- Shewen PE, Wilkie BN. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of growing bacteria. *Am. J. Vet. Res.* 1985; **46**: 1212.
- 12.- Dereck AM, Simons KR, Confer AW, Panciera RJ, Clinkenbeard KD. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. *Infect Immun.* 1989; **57**: 711-716.



- 13.- Sutherland AD, Donachie W. Cytotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. *Vet. Microbiol.*1986; **11**: 331.
- 14.- Aguilar TC, Tórtora PJ. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F., Memoria de III Congreso Nacional de Producción Ovina. 146. (1989).
- 15.- Lea Master BR, Evermann JF, Lehmkuhl HD. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootic of respiratory tract disease in recently weaned lambs. *J.A.V.M.A.* 1987; **190**: 1545.
- 16.- Lopez A, Maxie MG, Savan M, Ruhnke HL, Thomson RG, Barnum DA, Geissinger HD. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with Bovine Virus Diarrhea or *Mycoplasma bovis*. *Can. J. Comp. Med.*1982; **46**:302.
- 17.- Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Frontiers in bioscience.* 2001; 6:1128-1150
- 18.- Confer AW, Panciera RJ, Corsvet RE, Rummage JA, Fulton RW. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 1984; **45**: 2543.
- 19.- Confer AW, Panciera RJ, Fulton RW, Gentry MJ, Rummage JA. Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 1985; **46**: 342.
- 20.- Dereck AM, Simons KR, Confer AW, Panciera RJ, Clinkenbeard KD. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. *Infect Immun.* 1989; **57**: 711-716.
- 21.- Aley MR, Clarke JL. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. *N. Z. Vet. J.* 1977; **25**: 200
- 22.- Briggs RE, Frank GH. Increased elastase activity in nasal mucus associated with nasal colonization by *Pasteurella haemolytica* in infectious bovine rhinotracheitis virus-infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 1992; **53**:631-635.
- 23.- Abdullah KM, Udoh EA, Shewen PE, Mellors A. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. *Infect. Immun.* 1992. **60**:56-62
- 24.- Lee CW, Lo RY, Shewen PE, Mellors A. The detection of the sialoglycoprotease gen and assay for sialoglycoprotease activity among isolates of *Pasteurella haemolytica* A1 strains, serotypes A13, A14, T15 y A16. *FEMS Microbiol. Let.* 1994. **121**:199-206.
- 25.- Lee CW, Shewen PE, Cladman WM, Conlon JAR, Mellors A, Lo RY. Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: Detection of anti-sialoglycoprotease antibodies in sera of calves. *Can. J. Vet. Res.* 1994; **58**:93-98

- 26.- Confer AW, Durham JA, Clarke CR. Comparison of antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1 grown *in vitro* and *in vivo*. Am. J. Vet. Res. 1992; **53**:472-476.
- 27.- Confer AW, Durham JA. Sequential development of antigens and toxins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1 grown in cell culture medium. Am. J. Vet. Res. 1992; **53**:646-652
- 28.- Mosier DA, Simons KR, Chengappa MM, Confer AW. Antigenic composition of *Pasteurella haemolytica* serotype-1 supernatants from supplemented and nonsupplemented media. Am. J. Vet. Res. 1994; **55**:348-352
- 29.- Chang YF, Young R, Post D, Struck DK. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. 1987. **55**: 2348-2354
- 30.- Gonzalez CT, Maheswaran SK. The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: Review and hypothesis. Br. Vet. J. 1993; **149**: 183- 193
- 31.- Waurzyniak BJ, Clinkenbeard KD, Confer AW, Srikumaran S. Enhancement of *Pasteurella haemolytica* leucotoxic activity by bovine serum albumin. Am. J. Vet. Res. 1994; **55**:1267-1264.
- 32.- Czuprynski CJ, Noel EJ, Ortiz- Carranza O, Srikumaran S.. Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. Infect. Immun. 1991; **59**: 3126-3133.
- 33.- Maheswaran SK, Weiss DJ, Kannan MS, Townsend EL, Reddy KR, Whiteley LO, Srikumaran S. Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leucotoxin on bovine neutrophils: degranulation of generation of oxyge-derived free radicals. Vet. Immunol. Immunopathol. 1992; **33**: 51-68.
- 34.- Henricks PAJ, Binhorst GJ, Druver AA, Nuk AMP. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B4 and 5-hydroxyeicosatetranoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 1992; **60**: 3238-3243.
- 35.- Breider MA, Kumar S, Corstvet RE. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. Infect. Immun. 1990; **58**: 1671-1677.
- 36.- Breider MA, Kumar S, Corstvet RE. Interaction of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated damage to pulmonary endothelial cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 1991; **27**: 337-350.
- 37.- Paulsen DB, Confer AW, Clinkenbeard KD, Moiser, DA. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from and neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cell. Am. J. Vet. Res. 1990; **51**: 1635-1639.

- 38.- Malazdrewich C, Ames TR, Abrahamsen MS, Maheswaran SK. Pulmonary expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 in the acute phase of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Pathol.* 2001; **38**:297-310.
- 39.- Ricketts AP, Gordon JA, Harrigan MB, Froshauer S. A leukotoxin nonproducing mutant of *Pasteurella haemolytica*. Phagocytosis and killing by bovine polymorphonucleocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994; **15**:283-285.
- 40.- Petras SF, Chidambaram M, Illyes EF, Froshauer S, Reese CP. Antigenic and virulence properties of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infect. Immun.* 1995; **63**: 1033-1039.
- 41.- Chidambaram M, Sharma B, Petras SF, Reese CP, Froshauer S, Weinstock GM. Isolation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infect. Immun.* 1995; **63**:1027-1032.
- 42.- Kyd JM, Taylor D, Cripps AW. Conservation of Immune responses to proteins isolated by preparative polyacrylamide gel electrophoresis from the outer membrane of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 1994; **62**: 5652-5658.
- 43.- Murphy GL, Whitworth LC, Confer AW, Gaskins JD, Pandher K, Dabo SM. Characterization of a *Pasteurella haemolytica* A1 mutant deficient in production of three Membrane lipoproteins. *Am. J. Vet. Res.* 1998; **59**:1275-80.
- 44.- Cooney BJ, Lo RY. Three contiguous lipoprotein genes in *Pasteurella haemolytica* A1 which are homologous to a lipoprotein gene in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 1993; **61**:4682-4688.
- 45.- Confer, A.W., McCraw, R.D., Durham, J.A. et al. Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995; **47**: 101-110.
- 46.- Murray JE, Davies RC, Lainson FA, Wilson CF, Donachie, W. Antigenic analysis of iron-regulated proteins in *Pasteurella haemolytica* A and T biotypes by immunoblotting reveals biotype-specific epitopes. *J. Clin. Microbiol.* 1992 ;**138**: 283-288
- 47.- Potter AA, Schryvers AB, Ogunnariwo JA. Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. *Microb. Pathog.* 1999; **27**:197-206.
- 48.- Lee CW. Shewen PE. Evidence of bovine Immunoglobulin G<sub>1</sub> protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can. J. Vet. Res.* 1996; **60**:127-132

- 49.- Donachie W. Vaccine development against *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. International Conference of *Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella*. Edinburgh U.K. 1994
- 50.- Moe GR, Tan S, Granoff DM. Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1999; **26**:209-226.
- 51.- Cowan ST, Steel KJ. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. 2ª edición. Compañía Editorial Continental. México, 1979.
- 52.- Frank GH, Wessman GE. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. J. Clin. Microbiol. 1978; **7**: 142.
- 53.- Shewen PE, Wilkie BN. *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by typespecific rabbit antisera. Am. J. Vet. Res. 1983; **44**:715.
- 54.- Behymer D, Riemann H. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Guía de Laboratorio. Laboratorio Multidisciplinario, área de Hematología y Serología. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Baja California. México, 1998.
- 55.- Mishell BB, Stanley MS. Selected Methods in Cellular Immunology. 1a. edición. WH Freeman and Co. USA 1980. pp. 219-224
- 56.- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl. Short Protocols in Molecular Biology. 3<sup>rd</sup>. Edition. Wiley and Sons, Inc. USA. 1995.
- 57.- Luna LG, Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute Pathology. 3ed. Edition. Mac Graw-Hill Book Company. USA, 1968: 36-38.
- 58.- Clarke JM, Morton RJ. Development of an *in vitro* fluorometric assay to study adherence of *Pasteurella haemolytica* to bovine cells. Am. J. Vet. Res. 2000; **61**: 129-132.
- 59.- Al-Ghamdi GM, Ames TR, Baker JC, Walker R, Chase CC, Frank GH, Maheswaran SK. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. J. Vet. Diagn. Invest. 2000; **12**: 576-578.
- 60.- Jacques M, Paradis SE, Adhesin-receptor interactions. International Conference of *Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella*. México 1996.
- 61.- Lo RY. 2001. Genetic análisis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. Vet. Microbiol. **83**:23-35
- 62.- Gonzalez CT, Maheswaran SK. The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: Review and hypothesis. Br. Vet. J. 1993; **149**: 183- 193

- 63.- Morales AJF, Jaramillo ML, Ayala AD, Trigo TFJ.. Evaluación de fagocitosis, efecto bactericida y citotoxicidad de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* en macrófagos alveolares en bovinos. Rev. Lat.-Amer.Microbiol. 1994; **36**: 57-66
- 64.- González RN, Cruz ST, Mendoza ES, Hernández BE, Colmenares VG, Romero RA, Tórtora PJL, Ciprián CA. Evidencia por microscopía electrónica de barrido del daño al epitelio mucociliar producido por la interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en pulmón de cerdo. Téc. Pecu. Méx. 1999; **37**: 31-42.
- 65.- Hogdson C. Lipopolysaccharide chemotypes of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Bacteriology. Morendum Research Institute.2002
- 66.- Mosier DA., Simons KR., Chengappa MM., and Confer AW. 1994. Antigenic composition of *Pasteurella haemolytica* serotype -1 supernatants from supplemented and nonsupplemented media. Am. J. Vet. Res. **55**:348-352.
- 67.- Confer AW., and Durham JA., 1992. Sequential development of antigens and toxins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1 grown in cell culture medium. Am. J. Vet. Res. **53**:646-652.
- 68.- Weldon SK, Mosier DA, Simons KR, Craven RC, Confer AW. Identification of a important antigen of *Pasteurella haemolytica* Vet. Microbiol. 1994; **40**:283-291.
- 69.- Brodgen K, Clarke C. Increase of glycocalyx and altered lectin agglutination profiles of *Pasteurella haemolytica* A1 after incubation in bovine subcutaneous tissue chambers *in vivo* or in ruminant serum *in vitro*. *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*. 96 International Conference. México, 1996.
- 70.- Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, Panciera R, Alvarez LE, Rinehart C. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leucotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. Infect. Immun. 2000; **68**:3916-3922.
- 71.- Odendaal MW, Plessies L. The influence of *Mannheimia haemolytica* A1 seed culture inoculum cell density on the production of leucotoxin in submerged culture supernatant. Onderspoort J. Vet. Res. 2000; **67**: 205-216.
- 72.- Davies RL, Arkinsaw S, Selander RK.. Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep. Infect. Immun. 1997; **65**: 3585-3593.
- 73.- Davies LR., Campbell S., and Whittam TS. 2002. Mosaic Structure and molecular Evolution of the leucotoxin operon (lktCABD) in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. J. Bacteriol. **184**: 266-277.

- 74.- Fedorova ND, Highlander SK. Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* y creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect. Immun.* 1997; **65**: 2593-2598.
- 75.- Blackall PJ, Bisgaard M, Stephens CP. Phenotypic characterization of Australian sheep and cattle of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aust. Vet. J.* 2002; **80**: 87-91.
- 76.- Murphy GL, Robinson LC, Burrows GE. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31**:2303-2308.
- 77.- De Rosa DC, Mechor GD, Staats JJ, Chengappa MM, Shryock. Comparison of *Pasteurella* spp. Simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.* 2000; **38**:327-332
- 78.- Scanlan CM, Purdy CW, Foster GS. Combined enzyme and antimicrobial susceptibility profiles of caprine *Pasteurella haemolytica* serovar 2 respiratory tract isolates. *Cornell Vet.* 1993; **83**:303-309.
- 79.- Narita M, Kimura K, Tanimura N, Arai S, Tsuboi T, Katsuda K. Immunohistochemical Characterization of calf pneumonia produced by the combined endobronchial administration of bovine Herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *J. Comp. Path.* 2000; **123**:126-134.
- 80.- Lee CW, Lo RG, Shewen PE, Mellors A. The detection of the sialoglycoprotease gene and assay for sialoglycoprotease activity among isolates of *Pasteurella haemolytica* A1 strains, serotypes A13, A14, T15 and A16. *FEMS Microbiol. Letters.* 1994; **121**:199-206
- 81.- Negrete AE, Tenorio GV, Serrano JJ, García CC, de la Garza M. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* 1994; **58**:83-86.
- 82.- Leite F, Sylte MJ, O'Brien S, Schultz R, Peek S, van Reeth K, Czuprynski CJ. Effect of experimental infection of cattle with bovine herpesvirus (BHV-1) on the ex vivo interaction of bovine leucocytes with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; **84**:97-110.
- 83.- Jeyaseelan S, Kannan MS, Briggs RE, Thumbikat P, Maheswaran SK. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leucocytes, which induces biological effects. *Infect. Immun.* 2001; **69**:6131-6139.
- 84.- Deshpande MS, Ambagala TC, Ambagala APN, Kehri ME, Srikumaran S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infect. Immun.* 2002; **70**:5058-5064.

- 85.- Leite F, O'Brien S, Sylte MJ, O'Brien S, Page T, Atapattu D, Czuprynski CJ. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leucotoxin with bovine peripheral blood neutrophils *in vitro*. Infect. Immun. 2002; **70**:4336-4343.
- 86.- Cudd LA, Ownby CL, Clarke CR. Effects of *Mannheimia* leucotoxin on apoptosis and oncosis of bovine neutrophils. Am. J. Vet. Res. 2001; **62**: 136-142.
- 87.- Sun Y, Clinkenbeard KD, Cudd LA, Clarke CR, Clinkenbeard PA, Correlation of *Pasteurella haemolytica* leucotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. Infect. Immun. 1999; **67**:6264-6269.
- 88.- Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. En: Radi ZA, Brodgen KA, Dixon RA, Gallup JM, Ackermann MR. A selectin inhibitor decreases neutrophil interaction during acute *Mannheimia haemolytica* pneumonia. Vet. Pathol. 2002; **39**:697-705.
- 89.- Radi ZA, Brodgen KA, Dixon RA, Gallup JM, Ackermann MR. A selectin inhibitor decreases neutrophil interaction during acute *Mannheimia haemolytica* pneumonia. Vet. Pathol. 2002; **39**:697-705.
- 90.- Lafleur RL, Malazdrewich C, Jesaseelan S, Bleifield E, Abrahamsen MS, Maheswaran SK. Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. Microbial. Pathogenesis. 2001; **30**:347-357.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**Anexo 1. Lista de aislamientos obtenidos de pulmones neumónicos y de cavidad nasal en corderos para la evaluación de sus propiedades patogénicas.**

Hoja 1/3

Identificación	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	Origen	Motilidad	Indol	Crecimiento en Mc Conkey	O/F	Serotipo
Ov 2	+		N	-	-	-	F	A2
PmA		+		-	+	+	F	
PmD		+		-	+	+	F	
Ov1a	+		N	-	-	-	F	A1
l c	+		M	-	-	-	F	A2
B 1	+		N	-	-	-	F	A2
M 1	+			-	-	-	F	
Ph 1*	Referencia			-	-	-	F	
A 2	Referencia			-	-	-	F	A2
Ov 2b	+		N	-	-	-	F	A2
Ov4 c	+		N	-	-	-	F	A5
Ty 6	Referencia			-	-	-	F	
8 a	+		M	-	-	-	F	A2
9 a	+		M	-	-	-	F	A1
M 9	+		M	-	-	-	F	
St 9	Referencia			-	-	-	F	
Ov12 a	+		N	-	-	-	F	
Ov13 a	+		N	-	-	-	F	A1
Ov14	+		N	-	-	-	F	
M 16b	+		M	-	-	-	F	A1
17 a		+	N	-	+	+	F	
M 17*	+		M	-	-	-	F	A2
Ov 17	+		N	-	-	-	F	A2
M 19	+		M	-	-	-	F	A2
Ov 20a	+		N	-	-	-	F	A2
Ov19	+		N	-	-	-	F	A2
Ov 21	+		N	-	-	-	F	A2
N 23	+		N	-	-	-	F	A2
Ov34 b	+		N	-	-	-	F	A6
38	+		M	-	-	-	F	A5
Ov40	+		N	-	-	-	F	A2
Ov42	+		N	-	-	-	F	A1
0v37		+	N	-	+	+	F	
45	+		N	-	-	-	F	A2
Ov50	+		N	-	-	-	F	A5
51	+		M	-	-	-	F	A1
52	+		M	-	-	-	F	A2
54		+	M	-	+	+	F	
56 a		+	M	-	+	+	F	
C 124	+		N	-	-	-	F	A2
131 c	+		M	-	-	-	F	A2
133 a	+		M	-	-	-	F	A2
138 c	+		M	-	-	-	F	A2
R 147	+		N	-	-	-	F	A2
132c	+		M	-	-	-	F	A2
Temol	+		N	-	-	-	F	A2
Temo2	+		N	-	-	-	F	A2



Temo3	+		N	-	-	-	F	A2
78ag	+		N	-	-	-	F	A2
69b	+		M	-	-	-	F	A1
152 b	+		M	-	-	-	F	A2
133 c		+	M	-	+	+	F	
126 b		+	M	-	+	+	F	
136 b	+		M	-	-	-	F	A2
152 a	+		M	-	-	-	F	A2
136 a	+		M	-	-	-	F	NT
145 a	+		M	-	-	-	F	A2
145 b		+	M	-	+	+	F	
148 b	+		M	-	-	-	F	A2
125 a	+		M	-	-	-	F	A2
Ov 156	+		N	-	-	-	F	A2
132 a	+		M	-	-	-	F	A1
132 b	+		M	-	-	-	F	A2
151 a	+		M	-	-	-	F	A2
148 a	+		M	-	-	-	F	A1
121 b		+	M	-	+	+	F	
101 b		+	M	-	+	+	F	
102	+		M	-	-	-	F	A2
105 a	+		M	-	-	-	F	A2
112	+		M	-	-	-	F	A6
103	+		M	-	-	-	F	A2
Ov80		+	N	-	+	+	F	
84 a	+		M	-	-	-	F	A2
89		+	M	-	+	+	F	
92		+	M	-	+	+	F	
94	+		M	-	-	-	F	A2
95	+		M	-	-	-	F	A2
80 a	+		M	-	-	-	F	A1
85 b	+		M	-	-	-	F	A2
87	+		M	-	-	-	F	A2
113		+	M	-	+	+	F	
68b		+	M	-	+	+	F	
93	+		M	-	-	-	F	A2
Ov66a		+	N	-	+	+	F	
66b	+		M	-	-	-	F	A2
Ov60		+	N	-	+	+	F	
65b	+		M	-	-	-	F	A2
65c		+	M	-	+	+	F	
67c	+		M	-	-	-	F	A2
Ov80c		+	N	-	+	+	F	
71a	+		M	-	-	-	F	A2
72b		+	M	-	+	+	F	
73a	+		M	-	-	-	F	A2
73b		+	M	-	+	+	F	
74a	+		M	-	-	-	F	A2
74b		+	M	-	+	+	F	
78b		+	M	-	+	+	F	
78c	+		M	-	-	-	F	A2
75b	+		M	-	-	-	F	A2
78a		+	M	-	+	+	F	

Ov68		+	N	-	+	+	F	
77a		+	M	-	+	+	F	
Ov71		+	N	-	+	+	F	
Ov70	+		N	-	-	-	F	A2