



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Título:

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN
OVINOS CONTRA *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*).

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LAURA GARCÍA CELIS

TUTOR:
EFRÉN DÍAZ APARICIO

COMITÉ TUTORAL
FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
VÍCTOR R. TENORIO GUTIÉRREZ

CD. UNIVERSITARIA, D.F.

2007.



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.

ÍNDICE

Contenido	Página
Introducción_____	1
Antecedentes_____	2
Justificación_____	7
Objetivo general_____	8
Objetivos particulares_____	8
Hipótesis_____	8
Material y métodos_____	8
Análisis estadístico_____	18
Resultados_____	19
Discusión_____	24
Conclusión_____	28
Literatura citada_____	29
Apéndice 1 (figuras)_____	34
Apéndice 2 (Cuadros)_____	45

Evaluación de la respuesta inmune humoral en ovinos contra *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*)

Histophilus somni en los bovinos es causante de varias enfermedades como meningoencefalitis trombótica (MET) neumonía y problemas reproductivos. En ovinos se le ha asociado como el causante de algunas enfermedades similares. El Objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de la infección experimental en ovinos con *Histophilus somni* y la medición de diferentes isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) al utilizar como antígeno una proteína de membrana externa de aproximadamente 40 kDa por medio de ELISA indirecta. Se diseñaron dos experimentos. En el primer experimento se trabajó con 21 ovinos machos, de 3 a 8 meses de edad realizando tres grupos. Grupo 1, ocho animales se inocularon con *H. somni* (1×10^9 UFC/ ml) por la vía intratraqueal. Grupo 2, ocho animales se inocularon por vía intrauretral la misma dosis. Grupo 3, tres animales inoculados con SSF por vía intratraqueal y dos por vía intrauretral. Se tomaron constantes fisiológicas, se recolectaron muestras de exudado nasal y sangre para la serología. Los animales se sacrificaron a la quinta semana posterior al desafío, recolectando algunos órganos para estudio bacteriológico. Experimento dos se utilizaron 19 ovinos de la misma edad, se inmunosuprimieron los animales por cinco días con dexametasona, 1ml intramuscular. Al quinto día de la inmunosupresión se desafió con PI3 (1×10^6 TCID₅₀ /6ml), una semana después se formaron dos grupos, 16 ovinos fueron inoculados con *H. somni* a la misma dosis que el experimento uno, por vía intratraqueal y tres animales con SSF. Se tomaron constantes fisiológicas, exudado nasal y sangre. Se realizaron sacrificios semanales de tres animales, uno control y dos infectados, durante seis semanas recolectado órganos para estudio bacteriológico. En el experimento uno un 37% presentó fiebre mientras que en el segundo un 47% al infectar con PI3 y un 23% al inocular *H.somni*. En el sacrificio se observaron zonas de consolidación a nivel del lóbulo pulmonar apical y cardiaco, así como enfisema. Un 4.5% de animales presentaron adherencias entre la pleura y el miocardio. Del estudio bacteriológico solo se obtuvo un aislamiento de *H. somni* a partir del nódulo retrofaringeo. Del estudio serológico se observó una diferencia ($p < 0.05$) en la medición del isotipo IgG, no presentándose en los otros dos isotipos. Por lo que *H. somni* no infectó a los ovinos por ninguna vía aunque si despertó una respuesta inmune con la inmunoglobulina IgG, no observándose una diferencia al usar la proteína de 40 kDa.

(Palabras claves: Ovinos, *H. somni*, IgG, ELISA)

Evaluación de la respuesta inmune humoral en ovinos contra *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*)

Introducción

Histophilus somni (*Haemophilus somnus*) es un patógeno que infecta a bovinos de cualquier edad, teniendo un impacto económico importante en la producción de leche y carne (Tagawa *et al.*, 1993; Lederer *et al.*, 1987; Howard *et al.*, 2004). *H. somni* en los bovinos, es causante de varias enfermedades como meningoencefalitis tromboembólica (MET) presentándose los primeros reportes en Estados Unidos y Canadá en ganado productor de carne; actualmente la incidencia de MET es esporádica. La neumonía es una de las principales enfermedades asociadas a *H. somni*, a fiebre de embarque es otro de los padecimientos causados por esta bacteria y puede estar asociada con *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*;; aunque también provoca septicemia, miocarditis, artritis, aborto, infertilidad y mastitis (Tagawa *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2004; Siddaramppa e Inzana 2004).

H. somni también ha sido aislado en animales clínicamente sanos a partir del prepucio, semen, tracto respiratorio, por lo que se considera parte de la microbiota permanente (Ward *et al.*, 1995).

Un organismo similar al que se le nombró *Histophilus ovis*, fue aislado de un ovino con meningoencefalitis tromboembólica, posteriormente se determinó que también fue causante de mastitis, epididimitis, orquitis, metritis, septicemia, neumonía y poliatritis (Philbey *et al.*, 1991; Wayne *et al.*, 1994; Cassidy *et al.*,

Antecedentes

El primer reporte de la presencia de *H. somni* en ovinos, fue en una hembra con mastitis (Roberts, 1956), posteriormente Katen *et al.*, (1962) la aisló de corderos que presentaban septicemia, otros reportes asociados con *H. somni* en ovejas se presentaron en 1977 al ser aislada de un carnero con neumonía, miocarditis y lesiones en el sistema nervioso central (Stephens *et al.*, 1983). En Sudáfrica, se logró el aislamiento de *H. somni* a partir de un cordero con epididimitis; en Canadá se ha aislado a partir de descargas vaginales (Stephens *et al.*, 1983; Walter, *et al.*, 1988). Se ha reportado también como causante de MET en ovejas de Australia (Philbey *et al.*, 1991), en 1993 se presentaron casos de septicemia en Nueva Zelanda en donde se aisló *H. somni* (Kearney and Orr 1993), en México se reportó un aislamiento de un cordero con epididimitis (Palomares *et al.*, 2005).

Es frecuente el aislamiento de esta bacteria de ovinos que no presentan manifestaciones clínicas, a partir de descargas vaginales, de prepucio y del tracto respiratorio, por lo que se considera que esta bacteria es parte de la microbiota normal. En un estudio realizado en el Estado de México se aisló *H. somni* de moco vaginal y de prepucio de borregos clínicamente sanos. (Sosa, 2005)

Existe poca información con respecto a la presencia de *H. somni* en los ovinos. En un estudio realizado por Ward *et al.* (2006) se obtuvo el aislamiento de carneros de las montañas rocosas (*ovis canadensis nelsoni*), de una bacteria con las mismas características de *H. somni* a partir de prepucio, vagina y en un caso de neumonía.

Características de la bacteria.

H. somni se describe como un cocobacilo pleomórfico Gram negativo perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, es aerobio facultativo y no tiene cápsula. Para su crecimiento se requiere una atmósfera de 5 a 10% de CO₂ usándose un medio suplementado con sangre o suero además de extracto de levadura. *H. somni* no requiere del factor V (NAD) ni el factor X (hemina) para su crecimiento (Angen *et al.*, 1998; Angen *et al.*, 2003). Las colonias en agar

chocolate son de color amarillo, convexas, húmedas y con una consistencia grasosa, de un diámetro de 1-2 mm a las 48 a 72 h de crecimiento (Siddaramppa and Inzana, 2004; Humphrey and Stephens, 1983). La mayoría de las cepas de *H. somni* son positivas a fosfatasa alcalina, reducción de nitritos, oxidasa e indol; resultan negativas a la producción de catalasa, en arginina deshidrogenasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa y ureasa; fermentan algunos azúcares como la glucosa, manosa y trealosa (Humphrey and Stephens, 1983).

Propiedades antigénicas

H. somni es un patógeno oportunista, ya que se presenta asociado a factores que favorecen su colonización como algunas bacterias: *A. seminis*, *Pasteurella multocida* y virus. La membrana externa (ME) de la bacteria representa la interfase entre el organismo y el medio ambiente extracelular, teniendo un papel importante para la supervivencia celular y la interacción huésped-bacteria. En la ME encuentran algunos factores de virulencia como son los lipooligosacáridos (LOS) que en base a su estructura se envuelven de ácido siálico impidiendo que el sistema inmune los reconozca. La sialilación de LOS es una estrategia para que *H. somni* no sea destruido por el hospedero, esto se ha observado sólo en cepas patógenas como la ATCC 2336, la cual es capaz de cambiar algunos enlaces del LOS que permiten que se una el ácido siálico (Michael *et al.* 2005). Esta bacteria también tiene la capacidad de producir *biopelícula* (Siddaramppa e Inzana, 2004; Steenbergen *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2005) que es la unión entre varias bacterias formando una matriz polimérica adherida a la superficie orgánica o inorgánica (Dunner, 2002). En la ME también se incluyen varias proteínas (PME), cuya secuencia amino terminal presenta homología con porinas de otras bacterias Gram negativas, aunque la función de este canal en *H. somni* no está bien determinado, se sabe que tienen la capacidad de estimular una respuesta inmune como lo hacen porinas de otras bacterias Gram negativas (Khan *et al.*, 2005).

Otras PME tienen la capacidad de inducir algunas clases de inmunoglobulinas, como son las de peso molecular de 39 a 41, 76 y 78 kDa. En el

caso de la PME de 40 kDa se ha utilizado en bovinos como antígeno o inmunógeno para desarrollar una respuesta inmune, brindando una buena protección al hospedero contra *H. somni* (Gogolewski *et al.*, 1988; Siddaramppa e Inzana, 2004).

En estudios *in vitro* se ha observado que *H. somni* es una bacteria intracelular, por lo que se le considera como una bacteria facultativa (Lederer *et al.*, 1987; Howard *et al.* 2004), ya que al introducirse por las mucosas, sea nasal o genital, es interceptada por los macrófagos locales y neutrófilos, los cuales la fagocitan pero no la matan ya que es capaz de inhibir la acción de los radicales libres de oxígeno (RLO), como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el anión peróxido (O₂⁻) y los radicales libres de oxígeno (OH), los cuales juegan un papel importante en la respuesta inmune innata (Yang *et al.* 1998; Tegtmeier *et al.*, 2000). Howard *et al.*, (2004) demostraron que algunas cepas de *H. somni* inhiben los RLO, principalmente aquellas cepas obtenidas de animales con neumonía a diferencia de las cepas aisladas de animales clínicamente sanos que no presentaron dicha inhibición a los RLO.

También se ha observado que *H. somni* provoca la apoptosis de los neutrófilos, al tener contacto con alguna proteína de la membrana del neutrófilo provocando la activación de las caspasas (Yang *et al.*, 1998).

Inmunidad.

La gran variedad de las PME en *H. somni* genera una respuesta inmune y de éstas se ha identificado a un grupo de proteínas que tienen afinidad por algunas clases de inmunoglobulinas, como son las de alto peso molecular (120, 270 y 350 kDa) y las llamadas proteínas unidas a inmunoglobulinas (IgBP) que tienen una fuerte afinidad con el isotipo IgG2, mientras que las de peso molecular medio, como la de 41 kDa, tiene una baja afinidad por éstas (Siddaramppa e Inzana, 2004). Tagawa *et al.*, (2000), encontraron que la proteína de 41 kDa induce una respuesta inmune débil, ya que su afinidad por la IgG1 e IgG2 es baja mientras que la proteína de 76 kDa, considerada como IgBP tuvo una mayor afinidad por las IgG2 (Corbeil *et al.*, 1997; Bastida-Corcuera *et al.*, 1999).

Varios estudios en bovinos han demostrado que *H. somni* produce una respuesta inmune humoral contra la enfermedad en bovinos (Tegtmeier *et al.*, 2000; O'Connor *et al.*, 2001; Gershwin *et al.*, 2005). Se ha observado que al desafiar novillas previamente vacunadas con células muertas de *H. somni*, no se desarrolló neumonía (Gogolewski *et al.*, 1987). Corbeil *et al.*, (1997), observó la capacidad que tiene la proteína de 40 kDa de ser un antígeno específico para el isotipo IgG2, permitiendo así proteger a novillas contra la neumonía por *H. somni*.

Epidemiología.

Desde que en 1959, en Colorado E.U.A., la meningoencefalitis trombótica fue descrita por primera vez, *H. somni* se ha reportado con una amplia distribución geográfica y aunque es considerado parte de la microbiota normal del bovino y ovino, la prevalencia como agente casual de enfermedad es común en producciones intensivas de bovinos. La mayoría de los reportes son en Canadá, E.U.A. y en el oeste de Europa, aunque han habido reportes de enfermedad causada por *H. somni* en Argentina, Australia, Bulgaria, República Checa, Egipto, Japón, Nueva Zelanda, el sur de África y Dinamarca. En E.U.A. existen dos casos reportados en bisonte. La localización y las condiciones climáticas no están asociadas con la presencia de la enfermedad causada por *H. somni*. (Rodríguez *et al.*, 1993; Tegtmeier *et al.*, 2000).

En México existen reportes del aislamiento de *H. somni* en bovinos con problemas reproductivos y respiratorios en los Estados de México, Puebla, Yucatán, Distrito Federal y Oaxaca (Rodríguez *et al.*, 1993).

En ovinos, se reportó el primer aislamiento en 2002 a partir de un carnero con epididimitis (Palomares *et al.*, 2005). En otro estudio, en el sur poniente del Estado de México se tomaron 146 muestras de ovinos clínicamente sanos de 4 a 8 meses de edad de prepucio y vagina, de las cuales se obtuvieron aislamientos de *H. somni* en el 15.7% de los machos y en el 100% de las hembras (Sosa, 2005).

Patogénesis.

La vía de entrada de *H. somni* son las mucosas en donde efectúa la colonización, se replica y causa daño al endotelio y el tejido, pero cómo suceden cada uno de estos pasos es desconocido (Corbeil, 1990). Dependiendo de la vía de entrada de *H. somni* en el hospedero, la enfermedad puede desarrollarse en un proceso agudo, crónico o simplemente no desarrollarse. La tasa de mortalidad varía considerablemente ya que se ven afectados pocos animales a un determinado tiempo, como es al mezclar ganado recién llegado con el ya establecido. El hacinamiento de los animales al ser transportados, permite que se presente la enfermedad, encontrándose algunas manifestaciones clínicas como muerte repentina, fiebre, anorexia, hiperestesia, ataxia, rigidez, ceguera, torpeza, sialorrea, tos y caquexia.

Es necesario confirmar la presencia de *H. somni*, en los animales con algunas de estas manifestaciones clínicas, ya que sólo algunas se han podido reproducir en desafíos experimentales en bovinos (Tegtmeier *et al.*, 2000; O'Connor *et al.*, 2001; Gershwin *et al.*, 2005). En animales de laboratorio, se ha observado una limitada reproducción de la enfermedad.

Si *H. somni* no es eliminado por el organismo comienza a provocar daño causando neumonía, consolidación pulmonar, abscesos, focos de necrosis, fibrina, edema, atelectasia. Microscópicamente se observan neutrófilos en los órganos afectados y se pueden hacer visibles algunas formas de *H. somni* (Groom *et al.* 1988; Tegtmeier *et al.*, 2000a)

Diagnóstico.

Para el diagnóstico se han empleado diversas pruebas serológicas, sin embargo, se presentan gran cantidad de reacciones cruzadas. Las pruebas utilizadas son: ELISA usando como antígeno la célula completa (Groom and Little, 1988; Gershwin *et al.* 2005), inmunodifusión en gel que es muy inespecífica (García-Delgado *et al.*, 1977). También se puede utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Palomares *et al.*, 2005) con base en la identificación del gen

rRNA 16s y el gen *rpoB* (Angen *et al.*, 2003). En la actualidad, no existe una prueba diagnóstica que resulte sensible y específica.

Justificación.

Existe poco conocimiento sobre los mecanismos de infección y la patogenicidad de *H. somni* en los ovinos y también se presentan escasos reportes de aislamientos.

Los antígenos utilizados para el diagnóstico serológico de *H. somni* en ovinos han resultado inespecíficos para precisar un diagnóstico certero.

En este trabajo se intentó desarrollar, mediante la infección experimental con *H. somni*, un cuadro neumónico y de epididimitis en ovinos, así como estandarizar una ELISA indirecta, utilizando como antígeno la PME de 40 kDa.

Objetivo general.

Medir la respuesta inmune humoral contra *H. somni* usando un modelo ovino.

Objetivos particulares

- 1.- Determinar la respuesta inmune humoral en ovinos inoculados con *H. somni*, midiendo los diferentes isotipos de anticuerpos (IgA, IgG, IgM).
- 2.- Purificar la proteína de membrana externa de 40 kDa de fracciones celulares de *H. somni*
- 4.-Estandarización de una ELISA indirecta utilizando como antígeno de captura la PME de aproximadamente 40 kDa.

Hipótesis.

La respuesta inmune provocada por el desafío experimental con *H. somni* es similar a la desarrollada por otros patógenos.

Material y Métodos

Cepas Bacterianas

Se utilizó la cepa de *H. somni* ATCC 2336 obtenida de un bovino con neumonía, procedente del cepario del laboratorio de bacteriología del CENID-Microbiología del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Previamente esta cepa fue inoculada en ovino y re-aislada a partir de pulmón. Para su crecimiento la cepa fue sembrada en placas de medio PPLO (DIFCO) adicionado con 0.5% de levadura y 7.5% de sangre de bovino (agar chocolate), incubando a 37°C durante 48 h en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂. La Bacteria fue cosechada en caldo nutritivo (PPLO) con glicerol y congelada en nitrógeno líquido hasta su uso.

Obtención de los antígenos.

Antígeno lisado por calor. Se inocularon con *H. somni* cinco placas de agar chocolate, incubando por 48 h a 37 °C en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂, la bacteria fue cosechada con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (PBS) estéril, el paquete celular se concentró a una transmitancia de 75% a una longitud de onda de 610 nm utilizando un espectrofotómetro Coleman Model 35. De la suspensión bacteriana se hicieron alícuotas de 1.5 ml y se centrifugó a 1,000 g/15 min, al paquete celular obtenido se le agregaron 30 µl de PBS estéril y 30 µl de amortiguador de muestra (Tris-HCl 0.5M pH 6.8, glicerol, SDS10% y azul de bromotimol 0.5%) para posteriormente ser sometido a lisis por calor a 98°C/5 min. La muestra fue conservada a -70°C.

Extracción de PME de aproximadamente 40kDa. El paquete celular obtenido con el mismo procedimiento descrito anteriormente para la obtención de las células, fue cosechado en PBS estéril, se lavó dos veces con la misma solución por medio de centrifugación a 10,000 g/10 min. Al paquete obtenido se agregaron 40 ml HEPES ((N-2-hidroxyethyl) piperazine-N'-(2-etanesulfonic acid),USB) 10mM pH 7.5 con los inhibidores de proteasas, fenilmethyl sulfunato-

fluoruro (PMSF, USB) 0.1M y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Invitrogen) 1mM. Esta solución fue sonicada a 10 pulsaciones por minuto, posteriormente se centrifugó a 10,500 g/20 min, el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo y se centrifugó a 150,000 g/1 h a 4°C. El sedimento obtenido, que contenía tanto la membrana interna como la externa, se le agregó 1 ml de sodium-N-Laurosarcosine (USB) al 1% y 9 ml de HEPES 10 mM pH 7.5, se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar a 150,000 g/1 h a 4°C, al sedimento fue recolectado, se le agregó HEPES 10 mM pH 7.2 y se homogenizó. Se tomaron 100 µl de la solución homogenizada y se le adicionaron 400 µl de metanol, se mezcló y se centrifugó a 8,500 g/1 min, se le agregaron 100 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 8,500 g/1 min, posteriormente se le agregaron 300 µl de agua destilada para separar la fase orgánica, se mezcló y se centrifugó nuevamente a 8,500 g/3 min. La fase superior fue desechada y se le agregaron 30 µl de metanol, se mezcló y se centrifugó a 8,500 g/5 min, posteriormente el sobrenadante se desechó y se dejó secar, ya seco se le agregaron inhibidores de proteasas (EDTA 0.2mM y PMSF 0.2mM) y se congeló a -70°C hasta su uso.

A partir de estas muestras se efectuaron corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 12.5% (SDS-PAGE.) en una Minicámara electroforética (BIO-RAD). La PME de aproximadamente 40 KDa se identificó por medio de marcadores de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder), la que fue cortada del gel para posteriormente ser electroeluida (electroelutor BIO-RAD) a 60mA por 60 min para la obtención de la proteína.

La proteína se recolectó en tubos Eppendorf (400 µl) y se le agregaron 1,100 µl de etanol, dejando precipitar por 1 h a -70°C, se centrifugó a 30,000 g/30 min, se desechó el etanol y el paquete celular se dejó secar para posteriormente agregarle inhibidores de proteasas (EDTA 0.2mM y PMSF 0.2mM). La proteína se conservó a -70 °C .

Cuantificación de proteína.

La cuantificación de la proteína se realizó por el método Micro BCA Protein, que es un paquete que sirve para detectar Cu^{++} al ser reducido por la presencia de

alguna proteína en un ambiente alcalino, la reacción se presenta con un color púrpura por la quelación de dos moléculas de ácido con un ión cuproso (Cu^{++}), esto se lee a una absorbancia de 562 nm en un espectrofotómetro (coleman modelo 35).

Para la estandarización de la concentración de proteína se preparó 1ml de albúmina sérica bovina a una concentración de 2.0 mg/ml. Se realizaron diferentes diluciones para obtener una curva de estandarización al medir la densidad óptica. (Cuadro 1.)

Experimento I.

Grupos e inoculación

Se trabajó con 21 ovinos Black belly de 3 a 8 meses de edad. Se formaron tres grupos de animales. Dos grupos de ocho ovinos y un grupo de cinco animales.

Los ocho animales del grupo 1 fueron inoculados por vía intratraqueal con *H. somni* a una dosis de 1×10^9 unidades formadoras de colonia (UFC)/ ml (Groom and Little, 1988), usando un volumen de 2.5 ml para cada animal.

El grupo 2 se inoculó por vía intrauretral con la misma dosis que el grupo 1.

El tercer grupo de cinco animales se inocularon con solución salina fisiológica estéril (SSF), tres animales por vía intratraqueal y dos por vía intrauretral.

Tres días previos al desafío y cinco días después de éste, se tomaron las constantes fisiológicas siguientes: frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura rectal.

Muestreo

Se realizaron 11 muestreos serológicos con intervalo entre ellos de tres días; el primero fue tomado previo al desafío experimental.

En los animales inoculados intratraquealmente (grupo 1) y en sus controles, se colectaron cada semana, muestras de exudado nasal para estudio bacteriológico.

A los animales inoculados por vía intrauretral (grupo 2) y a sus controles, se les tomaron semanalmente muestras de semen para estudio bacteriológico.

Sacrificio.

A la quinta semana posterior al desafío, los animales fueron sacrificados humanitariamente con base en los parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, SACRIFICIO HUMANITARIO DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS Y SILVESTRES, y bajo la supervisión del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (CICUAE) del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

De los animales del grupo 1, se obtuvieron órganos del aparato respiratorio: pulmones, los nódulos linfáticos retrofaríngeos, y mediastínicos así como las tonsilas.

De los animales del grupo 2, se obtuvieron órganos del aparato reproductor: testículo, epidídimo, glándulas seminales y bulbouretrales, uretra y prepucio.

Los mismos órganos se tomaron del grupo control dependiendo de la vía de inoculación.

Se observaron las lesiones macroscópicas durante la recolección de las muestras.

Estudio bacteriológico

Los órganos y tejidos obtenidos se maceraron para ser inoculados en placas de agar chocolate al igual que las muestras de exudado nasal y semen, todas las cajas se incubaron por 48 h a 37°C en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂. De las colonias sospechosas se realizaron frotis para tinción de Gram y en las que se observaron cocobacilos gram-negativos se les efectuaron resiembras.

Estudio serológico.

Isotipo IgG. Para la medición del isotipo IgG, se estandarizó una prueba de ELISA indirecta. Para determinar cuál era la dilución más adecuada del antígeno para la realización del ensayo, se probaron diluciones de 1:1,000 hasta 1:16,000 la

cuales se realizaron con PBS. Se estableció la dilución óptima de trabajo para los sueros, usando controles negativos y positivos de una dilución de 1:50 hasta de 1:800. El suero positivo fue obtenido de un ovino inmunizado con *H. somni*, y el negativo de un ovino sin problemas respiratorios aparentes y negativo tanto a la serología por inmunodifusión en gel como a la bacteriología.

El conjugado anti-IgG peroxidado de ovino (Jackson Immuno Research Laboratorios inc.) se probó a diluciones con PBS de 1:10,000 y 1:20,000 para determinar la concentración apropiada para realizar la prueba.

En placas de poliestireno se pegó el antígeno, ya fuese la célula completa lisada por calor o la PME de aproximadamente 40 kDa, esto se realizó a una dilución de 1:2,000 (4.1 µg/ml), utilizando como solvente PBS (pH 7.2). Se incubó por un día a 37°C, posteriormente se lavó tres veces con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 con 0.05% de Tween 20 (PBS-T (SIGMA)). Posteriormente se lavó dos veces con PBS y se desechó el último lavado. Las placas fueron bloqueadas con leche descremada al 4% diluida en PBS, durante un día a 4°C, posteriormente se lavaron en la forma descrita anteriormente y se les agregó el suero problema diluido en PBS a una concentración de 1:50, incubando durante una hora a 37°C. La placa se lavó nuevamente con PBS-T tres veces y dos veces con PBS, posteriormente se le agregó el conjugado anti-IgG peroxidado de ovino diluido en PBS a una concentración de 1:15,000 incubando durante una hora a 37°C, se realizaron nuevamente los lavados y se agregaron 100ul de ABTS [2,2'-azni-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid Fluka Biochemika) 10mg previamente disueltos en amortiguador de fosfatos Se colocó en agitación durante 15 min después de lo cual, se midió la absorbancia en un lector de ELISA (SIGMA Diagnostics) con un filtro de 405 nm.

Isotipo IgA. La medición del isotipo IgA se realizó a partir de las muestras del exudado nasal y para la realización de la estandarización de la prueba se realizó el procedimiento para el isotipo IgG utilizando diferentes diluciones para el antígeno, el exudado y el conjugado.

Para determinar la concentración del antígeno necesaria para la prueba se realizaron diluciones con PBS de 1:250 a 1:4,000. Para determinar la concentración de trabajo del exudado nasal se probaron diferentes diluciones de 1:20 a 1:160. Para la determinación de la dilución óptima del conjugado anti-IgA peroxidado de ovino (Bethyl Laboratorios Inc.) fueron realizadas diluciones en PBS de 1:1,000 a 1:5,000.

La placa se bloqueó con leche descremada al 4% y al igual que con el isotipo IgG, se realizaron el mismo número de lavados, el mismo tiempo de incubación para el suero y el conjugado anti-IgA peroxidado de ovino, el tiempo de agitación posterior a la aplicación de ABTS fue de 25 min. Finalmente, fue medida la absorbancia a 405 nm.

Isotipo IgM. Para la medición del isotipo IgM se realizó el mismo procedimiento que con los isotipos anteriores realizando diferentes diluciones en PBS en concentraciones de 1:50 hasta 1:3,200 para establecer la concentración del antígeno.

Para la determinación de la dilución del conjugado de anti-IgM peroxidado de ovino (Bethyl Laboratorios Inc.) se probaron diluciones en PBS entre 1:1,000 a 1:10,000. La dilución de los sueros fue de 1:50 a 1:800.

El tiempo de agitación de las placas fue de 15 min para posteriormente ser leído a una densidad óptica de 405 nm.

Experimento II.

Grupos e inoculación.

Se trabajó con 19 ovinos Black belly machos de 3 a 7 meses de edad, que fueron desparasitados con mebendazol (dosis 80 mg/kg) tres días antes de comenzar el experimento.

Los animales fueron inmunosuprimidos con dexametasona vía intramuscular (3mg/1.5 ml) un día antes de ser desafiados con virus PI3 a dosis de

1×10^6 dosis 50 infectante en tejido celular por mililitro(TCID₅₀ /ml) y siguiendo el tratamiento con dexametasona durante cinco días posteriores al desafío.

A los siete días post-inoculación con el virus PI3, 16 animales fueron inoculados con *H. somni* por vía intratraqueal, usando la misma concentración bacteriana del experimento I (1×10^9 UFC/ml), dejando dos animales como controles, a los que se les inoculó SSF estéril por la misma vía. Un animal fue sacrificado el día de la inoculación de la bacteria para observar las lesiones causadas por el virus PI3.

Previo al desafío con el virus de PI3 y durante catorce días posteriores se tomaron las siguientes constantes fisiológicas: frecuencias cardíaca y respiratoria, así como temperatura rectal.

Muestreos

Se realizaron 14 muestreos serológicos con intervalos de cuatro días. El primero se realizó previo al desafío con el virus PI3, el segundo previo al desafío con *H. somni*.

Semanalmente se colectaron muestras de exudado nasal para el estudio bacteriológico.

Sacrificio.

Previamente al desafío con *H. somni*, se sacrificó un animal de los que habían sido desafiados con PI3. Siete días posteriores al desafío con *H. somni* se sacrificaron tres animales, uno del grupo control y dos desafiados con *H. somni*, semanalmente y posteriormente sólo los animales desafiados. El sacrificio se realizó según lo establecido por la NOM-033-ZOO-1995 y el CICUAE del INIFAP

Se tomaron muestras de pulmones, tonsilas, nódulos linfáticos retrofaríngeos y mediastínicos, observándose las lesiones macroscópicas.

El estudio bacteriológico, se efectuó de la misma manera que se describió para el experimento I.

Estudio serológico.

La medición de los diferentes isotipos (IgG, IgA e IgM) se realizó como se describe en el experimento I.

PCR

Para determinar la presencia de ADN de *H. somni* en los tejidos de los ovinos inoculados se realizó la prueba de PCR.

El ADN fue extraído de la cepa de referencia de *H. somni* (2336 ATCC) previamente inoculado en ovino, en placas de agar chocolate incubadas a 37°C por 48 h en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂. Las células fueron cosechadas en 1.5 ml de PBS estéril para posteriormente realizar un conteo celular, para ésto se realizaron 14 diluciones décuples de esta suspensión, para establecer el número de UFC/ml de donde se obtuvo un conteo de 5.98×10^{15} UFC/ml. A partir de esta concentración se realizaron diluciones para obtener un valor de 1×10^9 UFC/ml hasta 1×10^0 UFC/ml.

Para determinar la sensibilidad de la técnica de PCR se realizaron extracciones de ADN de las diluciones de 1×10^9 UFC/ml hasta 1×10^0 UFC/ml esto se llevó a cabo por el método fenol-CTAB (Arellano, 1998). A 50 µl de suspensión bacteriana se le agregaron 5 volúmenes de solución de lisis (15% sacarosa, tris base 50 mM EDTA 50Mm) y lisozima (20mg/ml) a una concentración final de 0.8 mg/ml. Se incubó por 1 h a 37°C en baño maría y posteriormente se agregó SDS (Dodecíl Sulfato de Sodio) al 10% hasta una concentración final de 0.5% y proteinasa K a una concentración final de 0.1 mg/ml. La mezcla se incubó a 37°C durante 1h en baño maría, se agregó NaCl a una concentración final de 0.7M y CTAB-NaCl a una concentración final de 1%, se mezcló y se incubó a 65°C durante 10 min y posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo-alcóhol isoamilico (24:1), se mezcló y se centrifugó a 30,000 g/10 min. Se colectó la fase acuosa y se colocó en otro tubo sin tocar la interfase. A esta mezcla se le agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcóhol isoamilico (25:24:1) (fenol equilibrado con Tris-HCl 1M pH 8.0), se mezcló por 10 min de una manera suave y se centrifugó a 30,000 g/10 min. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo sin tomar de la

interfase y se le agregó un volumen del 6.0% de isopropanol, se mezcló hasta observar la precipitación de ADN y se centrifugó a 30,000 g/15 min. Se desechó el isopropanol sin tirar la pastilla y se agregó 1 ml de etanol al 70% se centrifugó a 30,000 g/20 min y se desechó el alcohol dejando secar para finalmente disolver 50 µl de TE (10:1). El ADN así obtenido se congeló a -70°C hasta su uso.

Para la amplificación del ADN por la técnica de PCR se utilizaron los iniciadores Hs1-ARF 5'-GAA/GGC/GAT/TAG/TTT/AAG/AG-3' y Hs2-ARF 5'-TTC/GGG/CAC/CAA/GTA/TTC/A-3' (Angen *et al.*, 1998; Tegtmerier *et al.*, 2000). En 2 µl de ADN obtenido de *H. somni* se agregaron 47 µl de una mezcla para la reacción que contenía 5µl de solución amortiguadora (Tris/HCL pH 8.3 10X), 2.5 µl dNTP al 100 µM, 2.0µl MgCl₂, 1µl de iniciador 1 (Hs1-ARF) e iniciador 2 (Hs2-ARF), 0.2µl Taq polimerasa y 35.3µl H₂O.

Las muestras fueron procesadas en un termociclador (Gene Amp PCR System 2400) utilizando dos programas en donde tuvieron una desnaturalización inicial de 94°C por 3 min. En el primer programa se realizaron 35 ciclos con una desnaturalización de 94°C por 1 min, una alineación de 42°C por 1 min y una extensión de 72°C por 1 min (Angen *et al.*, 1998); en el segundo programa se utilizó el mismo número de ciclos (35) con una desnaturalización de 94°C por 1 min, pero una alineación de 59°C por 1 min y una extensión de 72°C por 1 min y el ciclo final a 72°C por 7 min. La detección de la banda de amplificación se evaluó por corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1%.

Para determinar la especificidad de la prueba se realizaron extracciones de ADN de otros géneros bacterianos relacionadas con *H. somni* y que están dentro de la familia *Pasteurellaceae* y *Brucella ovis*. Las cepas a las que se realizaron extracciones de ADN a partir de cultivos puros fueron: *Actinobacillus seminis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Inmunotransferencia.

Se realizó el corrimiento electroforético a partir de células de *H. somni* rotas por calor en un gel de poliacrilamida a 12.5% durante 2 h a 120 V. Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de

nitrocelulosa de 0.2 μm de poro (BIO-RAD) a 400 miliAmpers (mA) durante 1 h. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 4% durante 24 h a 4°C. La membrana ya bloqueada se lavó con PBS-T en agitación durante 15 min repitiendo el lavado dos veces más, al finalizar se le agregó suero hiperinmune diluido en PBS con 1 % de leche descremada a una concentración de 1:100 y se dejó incubar por 24 h a 4°C. Se utilizaron sueros positivos a *H. somni*, *A. seminis*, *P. multocida*, *M. haemolytica* y *B. ovis*, la membrana fue lavada nuevamente con PBS-T tres veces durante 15 minutos y se le agregó conjugado anti-IgG peroxidado de ovino (Jackson Immuno Research Laboratorios inc.) diluido en PBS con 1% de leche descremada a una concentración de 1:100. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente, después de este tiempo, se lavó durante 15 min tres veces con PBS-T y se realizaron dos lavados más de 15 min con PBS. Para revelar la membrana, se le agregó la solución DAB-NiCo (3'3 diamino benzidina- Cloruro de Niquel más Cloruro de Cobalto (SIGMA), más agua oxigenada al 33% agitando suavemente hasta que se observaron las bandas de las proteínas.

Análisis estadístico.

Se realizó la prueba de T como análisis estadístico, comparando a los animales infectados con los controles comparando entre los días posteriores a la infección de los animales inoculados, con un valor de significancia de ($p < 0.05$).

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Palo Alto, DF.

Resultados

Obtención del Antígeno

En el corrimiento electroforético SDS-PAGE 12.5% se obtuvo una banda de aproximadamente 40 kDa que posteriormente fue electrodiluida del gel de poliacrilamida (Figura 1).

Cuantificación de proteína.

En cuantificación de la proteína obtenida se obtuvo una densidad óptica de 0.503 y 0.499 comparando con la curva de estandarización de la albúmina sérica bovina (cuadro 1) la concentración de proteína fue de 41.5 ug/ml (cuadro 1).

Experimento 1.

La medición en de las constantes fisiológicas, mostró variaciones en el 50% de los animales infectados y la presencia de algunas manifestaciones clínicas, como tos y exudado nasal muco purulento que se describen en la Cuadro 2.

Lesiones macroscópicas. A la eutanasia se observaron pequeñas zonas consolidadas en el pulmón a nivel del lóbulo cardiaco y del apical de los animales que fueron inoculados por vía intratraqueal y un 75% presentaron enfisema pulmonar.

En los animales del grupo 2, inoculados por vía intrauretral, no se presentó ninguna lesión macroscópica a nivel reproductivo y tampoco alguna manifestación clínica.

Estudio bacteriológico.

En los cultivos de los diferentes tejidos y órganos sólo se obtuvo crecimiento de bacterias consideradas como parte de la microbiota. El aislamiento de *H. somni* se obtuvo sólo de un animal, que presentó un absceso en el lóbulo pulmonar diafragmático.

Estudio serológico

Isotipo IgG

La dilución óptima del antígeno fue de 1:2000, la del suero 1:50 y la del conjugado anti-IgG de 1:15,000.

En la medición del isotipo IgG de los sueros de los animales inoculados intratraquealmente (grupo 1), se encontró una diferencia ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles al utilizar los dos tipos de antígeno (Cuadros 3 y 4), presentándose una mayor diferencia al utilizar la proteína de aproximadamente 40 kDa. (Figura 2 y 3)

No se observó ninguna diferencia ($p > 0.05$) a lo largo de los días en ninguno de los dos animales tanto los inoculados como los controles. (Cuadro 5 y 6)

En el caso de los animales del grupo 2 (inoculados intrauretralmente), se presentó el mismo patrón de reacción que el grupo 1 (Cuadros 7 y 8), se observó una diferencia ($p < 0.05$) entre los animales infectados y el grupo control, al utilizar ambos antígenos, la proteína de aproximadamente 40 kDa y la célula completa lisada por calor. (Figura 4 y 5)

La comparación entre los días del grupo 2 (inoculados intrauretralmente), se observó una diferencia ($p < 0.05$) en los animales infectados, al utilizar como antígeno la célula completa la diferencia se presentó el día 11 posinfección (Cuadro 9), mientras que al usar como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa, la diferencia se presentó hasta el día 18 posinfección (Cuadro 10).

Isotipo IgA

La dilución óptima del antígeno fue de 1:250, la del exudado nasal suero de 1:20 y la del conjugado anti-IgA de ovino 1:1000

En el caso de la medición del isotipo IgA en el exudado nasal, al comparar los resultados obtenidos del grupo 1 y 2, no se observó ninguna diferencia entre los animales infectados y los controles ($p > 0.05$) tampoco se observó entre los dos antígenos. (Figura 6 y 7) (Cuadros 11 y 12)

Al realizar la comparación estadística del isotipo IgA entre los días, al utilizar como antígeno la célula completa lisada por calor no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$), mientras que al usar como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) el día 7 posterior a la inoculación de los animales infectados. (Cuadro 13 y 14)

Isotipo IgM

La dilución óptima del antígeno fue de 1:100, la del exudado nasal de 1:50 y la del conjugado anti-IgM de ovino 1:1000

En la medición del isotipo IgM en el grupo 1, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y los animales inoculados en los días 4 y 11 posteriores a la inoculación, al utilizar como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa, mientras que con la célula lisada por calor se presentó una diferencia en los días 4 y 11 posterior a la inoculación, entre los animales infectados y los controles. (Figura 8 y 9) (Cuadros 15 y 16)

Al realizar la comparación entre días en el grupo 1, no se observó ninguna diferencia ($p > 0.05$) al comparar los animales infectados y los controles y entre los dos antígenos. (Cuadro 17 y 18)

En el grupo 2 se presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el día 4 y 7 posinoculación, entre los animales infectados y los controles, usando ambos antígenos (Figura 10 y 11) (Cuadros 19 y 20)

En la comparación estadística entre los días, sólo se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), el día 4 posterior a la inoculación al utilizar como antígeno la célula completa, mientras que al usar como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa no se presentó ninguna diferencia entre los días. (Cuadro 21 y 22)

Experimento II.

Al igual que en el primer experimento, se observaron alteraciones fisiológicas en 46.7% de los animales infectados (Cuadro 23). Los signos clínicos que se encontraron fueron: tos y exudado nasal muco purulento

Lesiones macroscópicas

El animal del grupo control que fue sacrificado antes de ser desafiado con *H. somni*, se presentó una zona de consolidación a nivel del lóbulo pulmonar apical.

En los borregos inoculados con *H.somni*, se observaron en un 59% de los casos pequeñas zonas consolidadas a nivel de los lóbulo pulmonar cardiaco y apical, así como enfisema.

Dos animales de lo 16 infectados presentaron adherencias entre la pleura y el miocardio

Estudio bacteriológico.

Se realizaron dos repeticiones independientes del estudio bacteriológico de los tejidos y los órganos colectados de los animales inoculados con *H. somni* y sólo en una muestra de nódulo retrofaríngeo se aisló la bacteria del grupo infectado.

Estudio serológico.

Isotipo IgG

En el experimento 2, la medición del isotipo IgG se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), los días 4 y 7 posteriores a la inoculación, entre los animales infectados y los controles utilizando ambos antígenos: la célula completa lisada por calor y la proteína de aproximadamente 40 kDa, (Figura 12 y 13) (Cuadros 24 y 25).

En los animales infectados la comparación entre los días, se presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los días 4 y 7 posinoculación, al utilizar como antígeno la célula completa, mientras que al utilizar como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa se observó una diferencia

estadísticamente significativa ($p < 0.05$) solamente el día 7 posinoculación. (Cuadros 27 y 28)

Isotipo IgA.

En la medición del isotipo IgA, no se podía realizar un estudio estadístico entre los animales controles y los infectados por el número de muestras. (Figura 14 y 15)

En la comparación entre los días de los animales infectados, se presentaron diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los días 7, 14, 28 y 36 pos infección, al utilizar como antígeno la célula lisada por calor, mientras que con la proteína de aproximadamente 40 kDa se presentaron diferencias ($p < 0.05$) en los días 7, 21 y 36 posinfección. (Cuadros 28 y 29)

Isotipo IgM.

En la medición del isotipo IgM se observó sólo una diferencia estadística ($p < 0.05$) en el día 11 posterior al desafío con *H. somni*, al utilizar ambos antígenos, (Figura 16 y 17) (Cuadros 30 y 31)

En la comparación entre días se observó una diferencia el día 4 posinfección, al utilizar como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa, mientras que al usar como antígeno la célula completa lisada por calor no se observó diferencia alguna ($p < 0.05$). (Cuadros 32 y 33)

PCR.

En el estudio de sensibilidad realizado mediante diluciones de *H. somni* de una concentración bacteriana de 1×10^9 UFC/ml a 1×10^0 UFC/ml, se observó que hubo una amplificación del ADN de *H. somni* hasta la dilución de 1×10^1 UFC/ml, donde amplificó una banda de 400 pb, la cual era el fragmento esperado al utilizar los iniciadores utilizados, tanto en la temperatura de alineación a 59.1°C y reduciendo el número de ciclos a 30, como al usar una temperatura de alineación de 42°C . se encontró una sensibilidad de 1×10^1 UFC/ml. (Figuras 19 y 20)

Al determinar la especificidad del PCR, con diferentes bacterias se observó que las cepas de *A. seminis*, *P. multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* amplifican el mismo número de bases que *H. somni*. Esto mismo sucedió al cambiar la temperatura de alineación a 59.1°C y reduciendo el número de ciclos, al elevar la temperatura de alineación a 59.5°C no amplificó el ADN de ninguna bacteria incluyendo a *H. somni*. (Figuras 21 y 22)

Inmunotransferencia.

En esta prueba se observó que la proteína de aproximadamente 40 kDa reaccionó con anticuerpos contra *A. seminis*, *P. multocida* y *M. haemolytica* no resultando específica. (Figura 23)

Discusión.

Experimento 1. En los animales del grupo 1 (inoculados vía intratraqueal) se observó que no desarrollaron procesos neumónicos, la presencia de absceso tipo caseoso en un animal y adherencias en pleura pudieron deberse a una lesión previa del animal, ya que no se aisló *H. somni*. En ovinos existe muy poca información de neumonías causada por *H. somni* el 10% de las referencias sólo mencionan que al haber aislado de lesiones neumónicas la bacteria se considera causante de neumonías (Corbeil *et al.*, 1997; Tagawa *et al.*, 2000). El 90% de las investigaciones realizadas con *H. somni* como causante de neumonía, se han realizado en bovinos en donde se ha observado que al inocular la bacteria, se provocan lesiones neumónicas en la zona cardiaca y apical de pulmón (Groom *et al.*, 1988). En este experimento, aunque en la mayoría de los animales se observó consolidación en estas zonas no se recuperó *H. somni* probablemente por que pudo ser controlado por el sistema de defensa del pulmón.

En el grupo 2 (inoculación por vía intrauretral), los animales no presentaron ninguna manifestación clínica, ni lesiones en el epidídimo; mostrando que *H. somni* no se estableció en ninguna de las zonas del tracto reproductor, además de que la bacteria no se aisló de ninguno de los órganos recolectados ni del semen

tomado cada semana. A *H. somni* se le ha considerado como uno de los agentes causantes de epididimitis en ovinos y en algunos de los casos no se reporta que se recupere la bacteria a partir de las lesiones (Walter *et al.*, 1988)

Jansen *et al.* (1983), al inocular *H. somni* en el aparato reproductor de carneros, observó que los neutrófilos y macrófagos eran capaces de proteger y destruir la bacteria sin la necesidad de la presencia de anticuerpos, ni del complemento. Tal vez se necesite de otros factores predisponentes para que la bacteria colonice el epidídimo y así desarrollar la enfermedad. Webb (1983) observó que para que la epididimitis se desarrollara tenía que inocular a *H. somni* directamente en el epidídimo.

Experimento 2. Al igual que en el primer experimento los ovinos no desarrollaron ningún proceso neumónico. Tegmeier *et al.* (2000) realizaron un estudio en bovinos inoculando *H. somni* junto con *Mycoplasma dispar* por vía intrataraqueal y observaron que los animales se inmunosuprimieron por la disminución en el conteo leucocitario y el desarrollo de neumonía en estos animales, mientras que al inocular solamente *H. somni* no se provocó ninguna lesión y presentaban leucocitosis. Gershwin *et al.*, (2005) desafiaron a bovinos con Virus Sincitial Respiratorio Bovino (BRSV) junto con *H. somni* logrando desarrollar bronconeumonía.

En esta investigación se deprimió el sistema inmune de los ovinos utilizando dexametasona y PI3 y aun así, no se estableció *H. somni* en los pulmones, y sólo se presentaron zonas con consolidación en la parte cardíaca y apical del pulmón y no se obtuvo el aislamiento de *H. somni*, por otro lado la lesión pudo haberse desarrollado por causa del virus (PI3).

Se ha observado que una cepa de *H. somni* aislada de neumonía de bovinos no causa la misma enfermedad en ovinos (Lee *et al.*, 1994), aunque los perfiles electroforéticos de cepas aisladas de bovino son parecidas a las cepas aisladas de casos clínicos en ovinos (Lee *et al.*, 1993). La cepa utilizada en este trabajo, como se mencionó en la metodología, se inoculó previamente en un ovino en el cual provocó pequeñas lesiones neumónicas pero sólo al inocular directamente en el pulmón más de una vez se logró producir la enfermedad;

quizás esta sea una de las razones por las que no se pudo reproducir la enfermedad en ninguno de los grupos experimentados.

En bovinos, se han aislado diferentes cepas de *H somni*, algunas se han obtenido de neumonías (2336 ATCC), de aborto (649), de encéfalo (8025) y de prepucio (129Pt); al desafiar animales con la cepa 8025 no se desarrolló neumonía, además al realizar pruebas de ELISA con suero de animales susceptibles, se presentaron variantes entre las diferentes cepas, lo que muestra que para desarrollar neumonías en bovinos se necesita cepas virulentas aisladas de pulmón, como la 2336 ATCC (Groom *et al.*, 1988).

Ward *et al.* (1995), con base en los resultados obtenidos al analizar el ribotipo y el biotipo de diferentes cepas de *H. somni* aisladas de ovinos y bovinos propusieron la siguiente hipótesis: “que las cepas aisladas de bovino no infectarán a un ovino y visceversa”.

Por lo que para desarrollar una infección en ovinos, tal vez se necesita una cepa aislada de ovino y tratar de causar neumonía o epididimitis dependiendo del sitio del que se obtuvo la cepa.

En el estudio serológico del experimento 1, al medir la IgG se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en ambos grupos, mostrando que *H. somni* si fue reconocido como un agente extraño, despertando una respuesta inmune humoral, al igual que cualquier otro microorganismo, pero no se desarrolló la enfermedad. Se observó que al utilizar como antígeno la célula completa hay una mayor diferencia estadística que al utilizar la proteína de aproximadamente 40 kDa, aunque ambos antígenos resultaron adecuados para la ELISA indirecta. En la mayoría de las investigaciones se utiliza la célula completa para la realización de ELISA, obteniendo buenos resultados (O'Connor *et al.*, 2001; Gershwin *et al.*, 2005).

En bovinos, el alotipo IgG2 es considerada como la inmunoglobulina que otorga mayor protección contra la infección, principalmente contra la neumonía, ya que activa el complemento además de que es una excelente opsonina (Gershwin *et al.*, 2005; Siddaramppa and Inzana, 2004).

La inmunoglobulina IgA es una importante defensa de las mucosas, en esta investigación no se presentó una diferencia entre los animales controles y los inoculados, ya que ambos presentaron una misma concentración de IgA en los diferentes días, estos resultados concuerdan con los publicados por Gershwin, *et al.* (2005) en becerros infectados con *H.somni*, donde la respuesta de IgA no presentó diferencia y lo atribuyen a una reacción cruzada con otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae*.

En la IgM se observó una diferencia al día 4 posinoculación al utilizar como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa. El isotipo IgM se presentó con una respuesta humoral primaria al exponerse con *H. somni* al igual que sucede con cualquier otro microorganismo

En este trabajo se puede observar que la proteína de aproximadamente 40 kDa no funciona como un antígeno específico, ya que no se observó una diferencia estadística ($p > 0.05$) entre los resultados con este antígeno y la célula completa. Se pudo observar en forma general en los análisis estadísticos, que la célula completa presentó una mejor reacción en los ELISAs que la proteína de aproximadamente 40 kDa.

Corbel *et al.*, (1991) menciona que la proteína de 40 kDa presentó reacción cruzada con proteínas de membrana externa de otras bacterias, en especial de la familia *Pasteurellacea*; así que esto ocasiona la presencia de falsos positivos en las pruebas de diagnóstico, al utilizar esta proteína como antígeno. Khan *et al.*, (2005) Consideran que esta proteína de 40 kDa, como un antígeno no específico y con poca afinidad al unirse con algunas inmunoglobulinas de varios animales. Esto se pudo observar en los resultados que se obtuvieron de la inmunotransferencia en donde se ve que la proteína de aproximadamente 40 kDa reaccionó con anticuerpos contra *A. seminis*, *P. multocida* y *M. haemolytica*, por lo que no sería una buena candidata para usarse como antígeno específico.

En la prueba de PCR se observa que no es posible confirmar la presencia de *H. somni* en los tejidos y órganos, por que la especificidad de esta prueba no dió los resultados que se presentan en otros trabajos, ya que detectaron la presencia de ADN de algunas bacterias de la familia *Pasteurellacea*. Según Angen

et al., (1998), al utilizar los iniciadores, que se utilizaron en este trabajo, la especificidad de la prueba resulta adecuada ya que no amplifican bacterias como *A. seminis* ni *P. multocida* al utilizar una temperatura de alineación de 42°C.

En nuestra investigación no resultó así ya que hubo amplificación con esa temperatura de alineación y también al aumentarla hasta 59.1°C para *A. seminis*, *P. multocida*, junto con *A. pleuropneumoniae*. Los resultados obtenidos, muestran que los iniciadores no específicos para realizar la identificación de *H. somni* a partir de los tejidos y órganos, por lo que se necesita de otros para poder obtener una buena especificidad

La sensibilidad que mostró la prueba es buena ya que amplificó el ADN de *H. somni* que se obtiene de una dilución con 10^1 UFC/ml.

Conclusión.

Se observó que *H. somni* provocó una respuesta inmune humoral en los ovinos que fueron infectados, como cualquier otro microorganismo al entrar al huésped. Desarrollándose los diferentes tipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) frente a *H. somni*.

Aunque la cepa utilizada en esta investigación (2336 ATCC) fue pasada por ovino previamente, no causó el desarrollo de alguna enfermedad en el aparato reproductor, ni respiratorio.

Para realizar la ELISA indirecta e identificar la presencia de anticuerpos contra *H. somni*, pueden usarse los dos antígenos, indistintamente la proteína de aproximadamente 40 kDa o la célula completa, por que no existe una amplia diferencia ($p > 0.05$) entre ellos. Sin embargo no resultan en diagnóstico específico, dado que tanto la célula completa como la proteína de aproximadamente 40 kDa reaccionan con anticuerpos de otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae*.

Literatura Citada.

Acosta Dibarrat Jorge Pablo. Patogenia de la epididimitis por *Actinobacillus seminis* en ovinos (Tesis de Maestría). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.

Angen O, Ahrens P, Tegtmeyer C. Development of PCR test identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. *Vet Microbiol* 1998; 63: 39-48.

Angen O, Ahrens P, Kuhnert P, Christensen H, Mutters R. Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. Nov. for the three species *incertae sedis* '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. *International J Syst and Evo Microbiol* 2003; 53:1449-1456.

Arellano Reynosa Beatriz. Comparación de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y bacteriología para el diagnóstico de *Brucella melitensis* en caprinos vacunados e infectados (Tesis de Maestría) México D.F. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1998.

Bastida-Corcuera FD, Nielsen KH, Corbeil LB. Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein a, protein G, and *Haemophilus somnus* IgBPs. *Vet Immunol and Immunopath* 1999; 71:143-149.

Cassid, JP, McDowell SWJ, Reilly GAC, McConnell WJ, Forster F, Lawler D. Thrombotic meningoencephalitis associated with *Histophilus ovis* infection in lambs in Europe. *Vet. Rec* 1997;140: 193-195

Corbeil LB. Molecular aspects of some virulence factors of *Haemophilus somnus*. *Can J Vet Res* 1990; 54: S57-S62.

Corbeil LB, Kania SA and Gogolewski RP. Characterization of immunodominant surface antigens of *Haemophilus somnus*. *Infect. and Immunol.* 1991; 59: 4295-4301.

Corbeil LB, Bastida-Corcuera FD and Beveridge TJ. *Haemophilus somnus* immunoglobulin binding proteins and surface fibrils. *Infect. and Immunol.* 1997; 65: 4250-4257.

Dunner WM. Bacterial Adhesion: Seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiol Rev* 2002;15: 155-166

García-Delgado GA, Little PB, Barnum DA. A comparison of various *Haemophilus somnus* strain. *Can J comp Med.* 1977; 41: 380-388

Gershwin LJ, Berghaus LJ, Arnold K, Anderson ML, Corbeil LB. Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection

Apéndice 1 Figuras

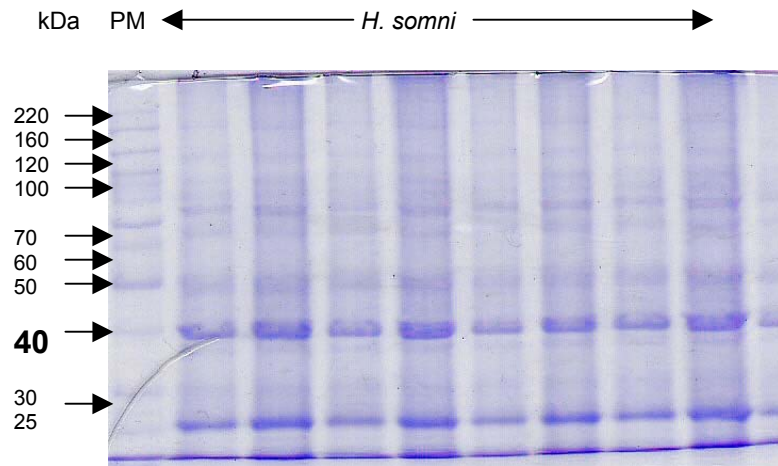


Figura 1. Separación de PME de *H. somni* en gel de poliacrilamida al 12.5%

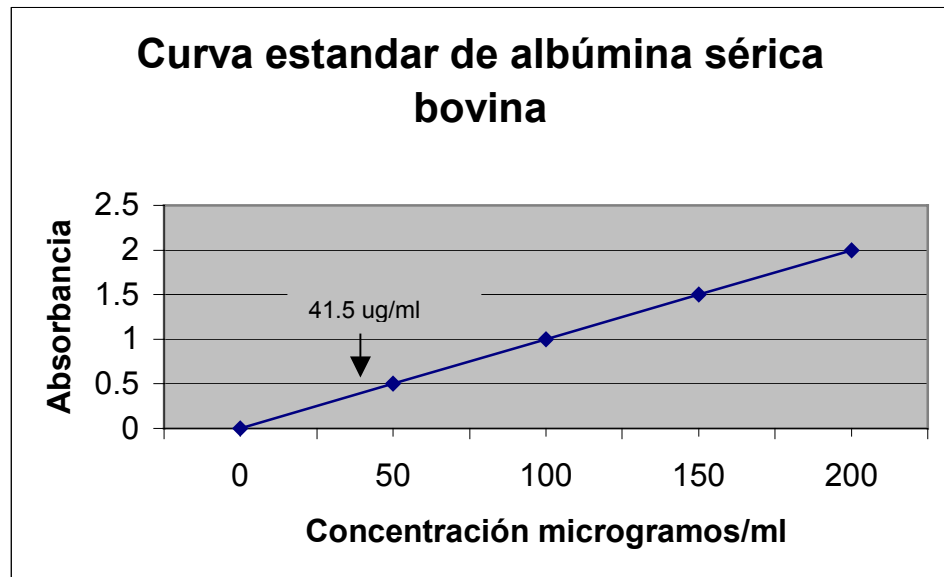


Figura 2. Curva de estandarización de la albúmina sérica bovina y la concentración de proteína obtenida

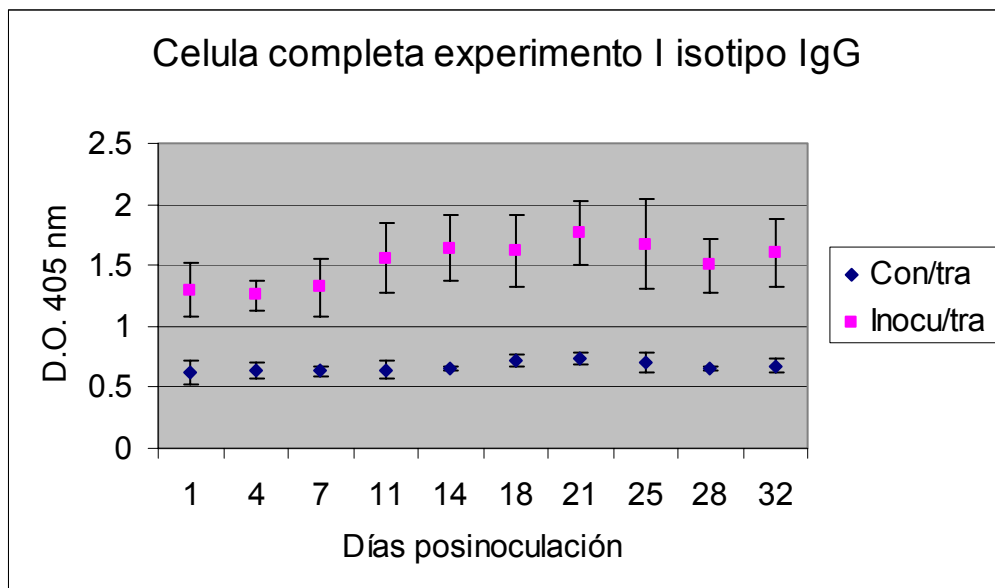


Figura 3. Medición del isotipo IgG mediante un ELISA indirecto del experimento I de los sueros colectados de los animales del grupo 1, utilizando como antígeno de captura la célula lisada por calor. Observadose una diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los animales infectados v los controles.

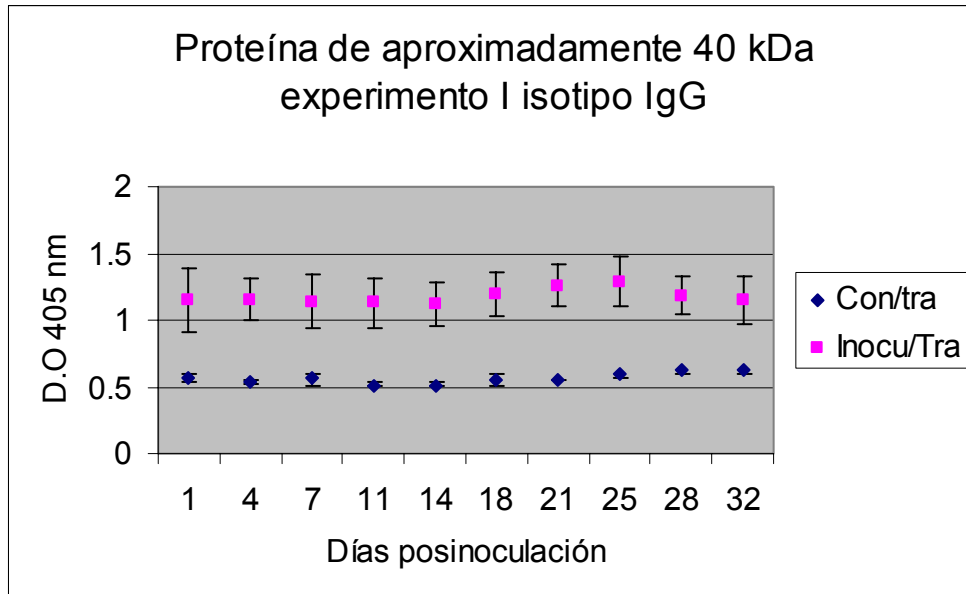


Figura 4. Medición del isotipo IgG mediante un ELISA indirecto del experimento I de los sueros colectados de los animales del grupo 1, utilizando como antígeno de captura la proteína de aproximadamente 40 kDa observándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los animales infectados y loa controles.

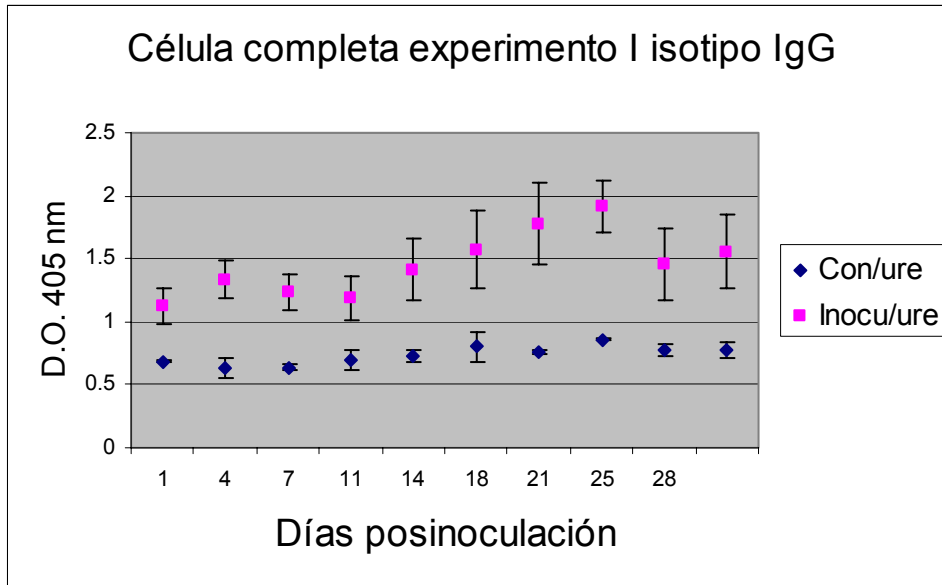


Figura 5. Medición del isotipo IgG mediante un ELISA indirecto del experimento I de los sueros colectados de los animales del grupo 2, utilizando como antígeno de captura la célula lisada por calor. Observándose una diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles

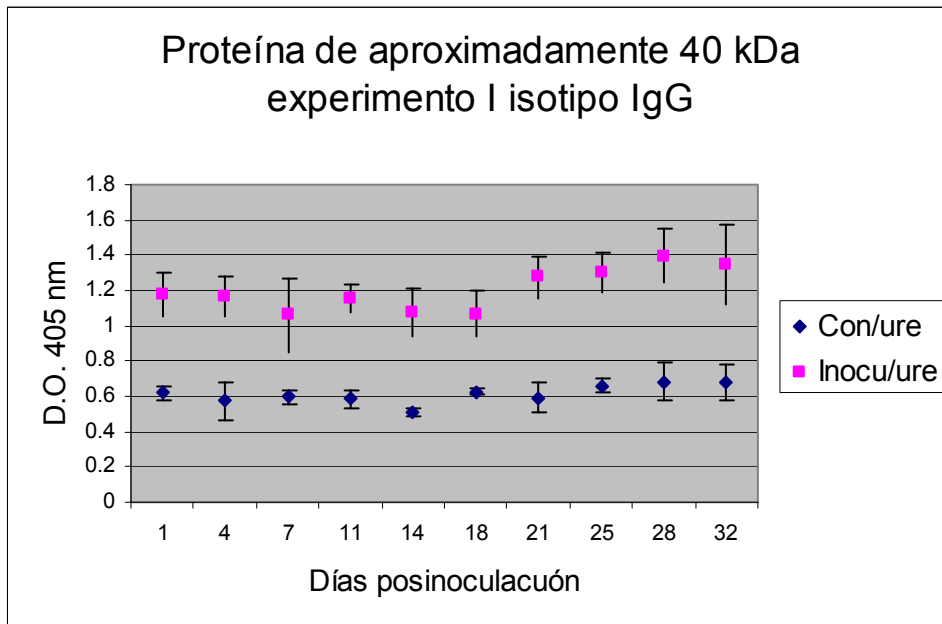


Figura 6. Medición del isotipo IgG mediante un ELISA indirecto del experimento I de los sueros colectados de los animales del grupo 2, utilizando como antígeno de captura la proteína de aproximadamente 40 kDa observándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles.

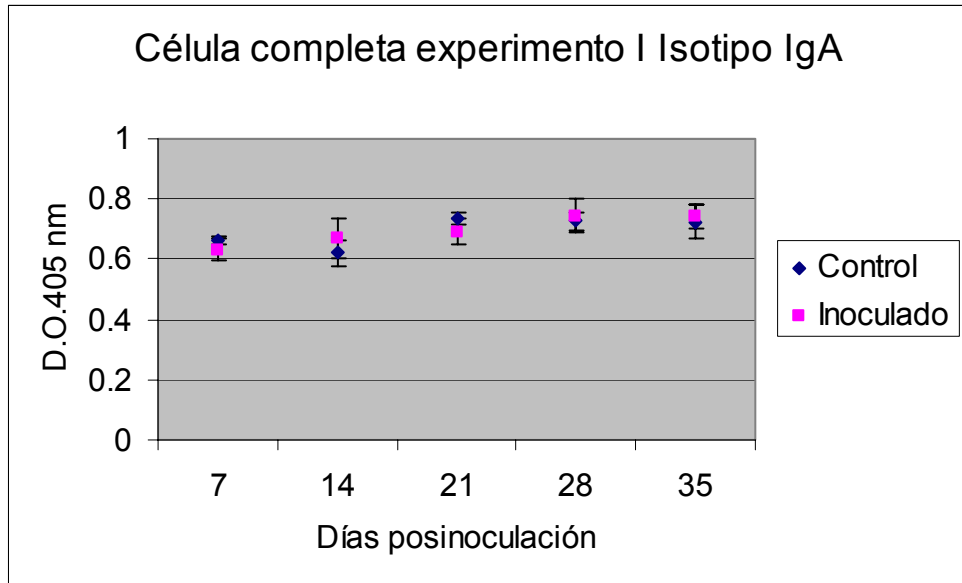


Figura 7. Medición del isotipo IgA mediante un ELISA indirecto del exudado nasal recolectado de los animales del grupo 1 del primer experimento I, utilizando como antígeno de captura la célula completa lisada por calor. Observadose que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los animales infectados y los controles.

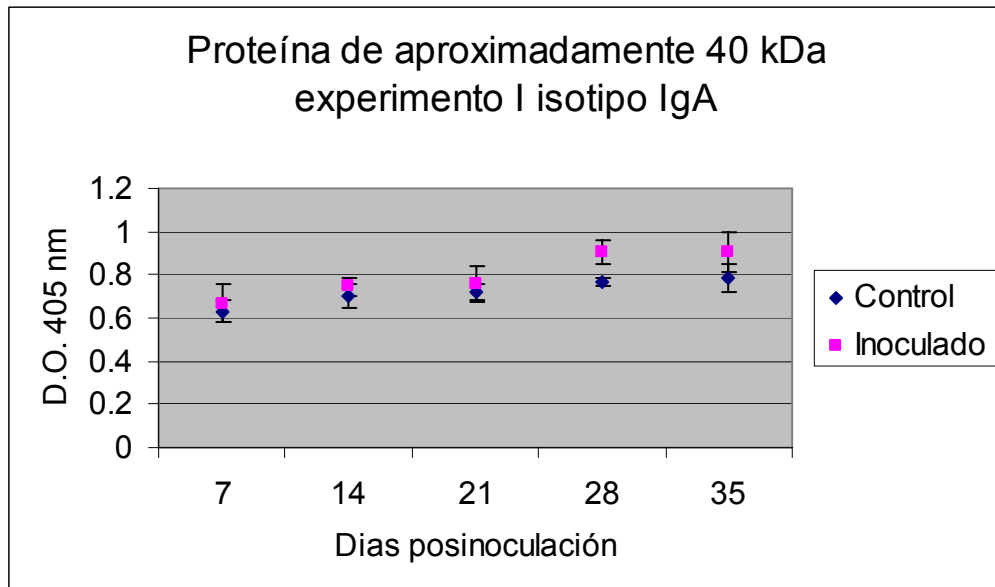


Figura 8. Medición del isotipo IgA mediante un ELISA indirecto del exudado nasal recolectado de los animales del grupo 1 del primer experimento I, utilizando como antígeno de captura la proteína de aproximadamente 40 kDa. Observadose que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los animales infectados y los controles.

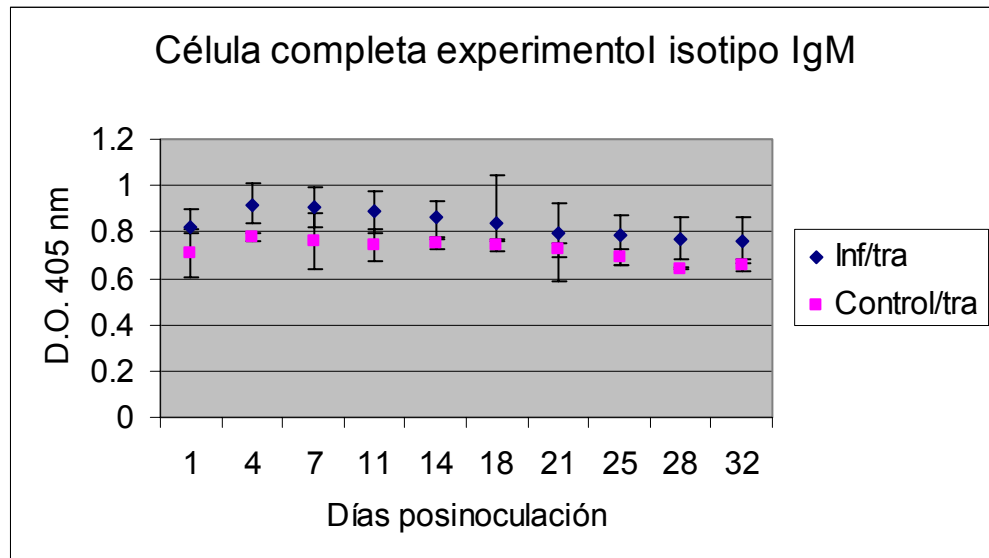


Figura 9. Medición del isotipo IgM mediante un ELISA indirecto del experimento I del los sueros tomados del de grupo 1, utilizando como antígeno de captura la célula lisada por calor. Observadose que una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles los días 4 y 11.

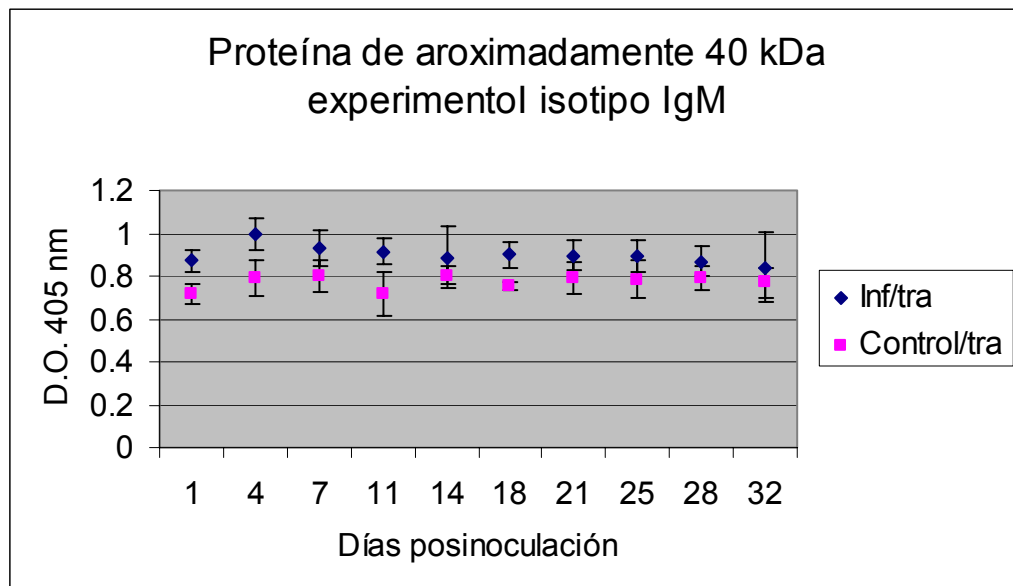


Figura 10. Medición del isotipo IgM mediante un ELISA indirecto del experimento I del los sueros tomados del de grupo 1, utilizando como antígeno de captura la proteína de aproximadamente 40 kDa. Observadose que una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles los días 4 y 11.

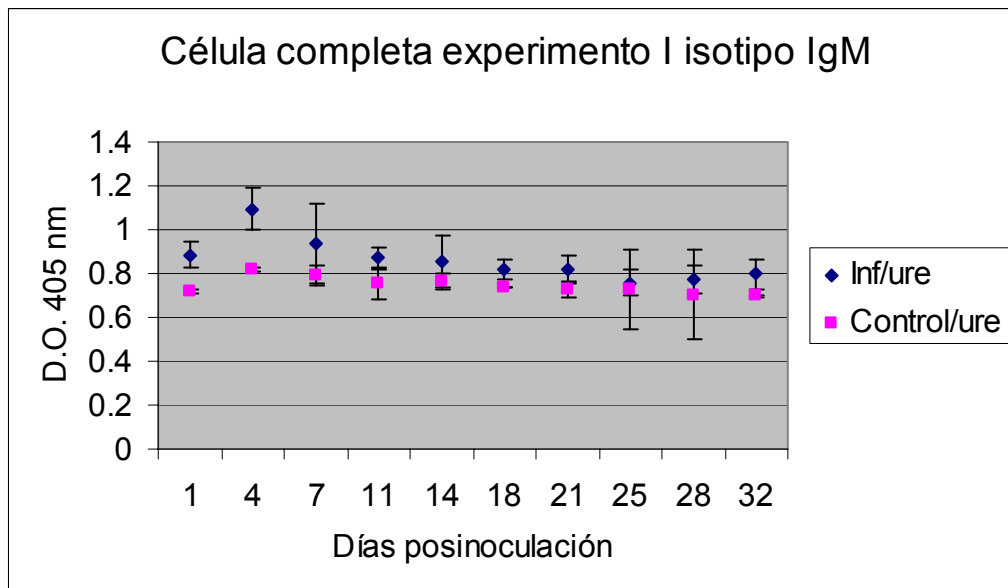


Figura 11. Medición del isotipo IgM mediante un ELISA indirecto del experimento I del los sueros tomados del de grupo 2, utilizando como antígeno de captura la célula completa lisada por calor. Observadose que una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los animales infectados y los controles el día 4.

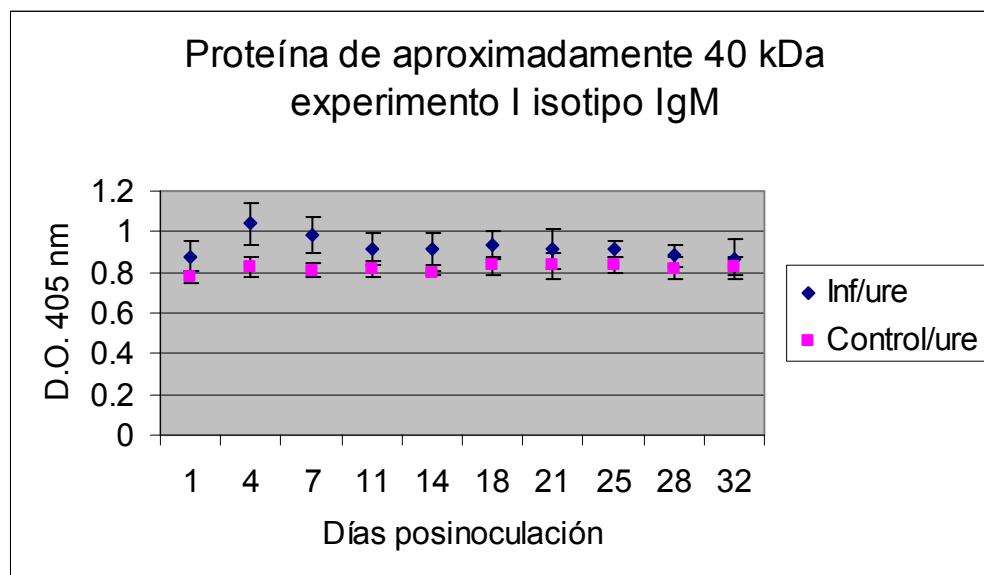


Figura 12. Medición del isotipo IgM mediante un ELISA indirecto del experimento I del los sueros tomados del de grupo 2, utilizando como antígeno de captura la proteína de aproximadamente 40 kDa. Observadose que una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los animales infectados y los controles los días 4 y 7 posteriores a la inoculación.

Experimento II

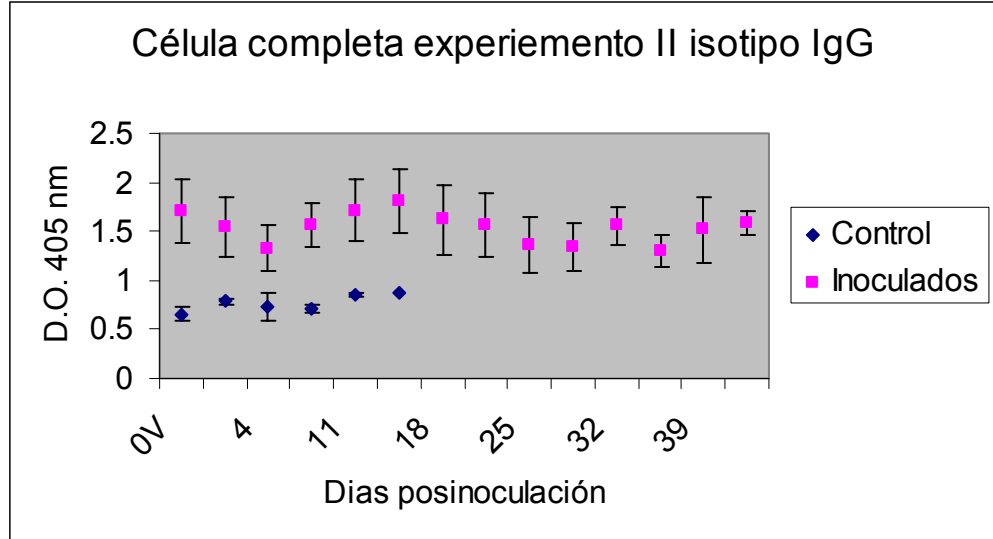


Figura 13. Medición del isotipo IgG mediante un ELISA indirecto de los sueros colectados del experimento II, utilizando como antígeno de captura la célula lisada por calor. Observadose una diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles.

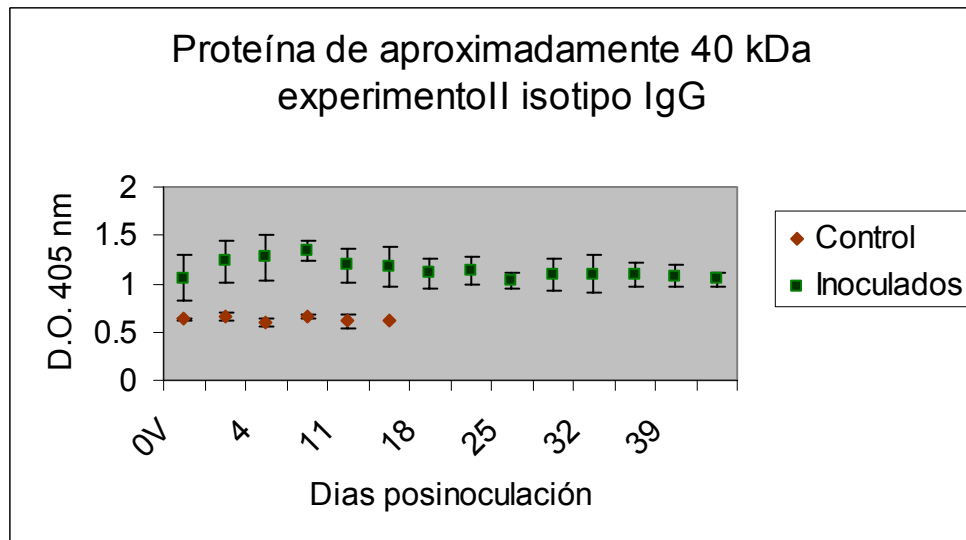


Figura 14. Medición del isotipo IgG mediante un ELISA indirecto de los sueros colectados del experimento II, utilizando como antígeno de captura la proteína de aproximadamente 40 kDa. Observadose una diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles.

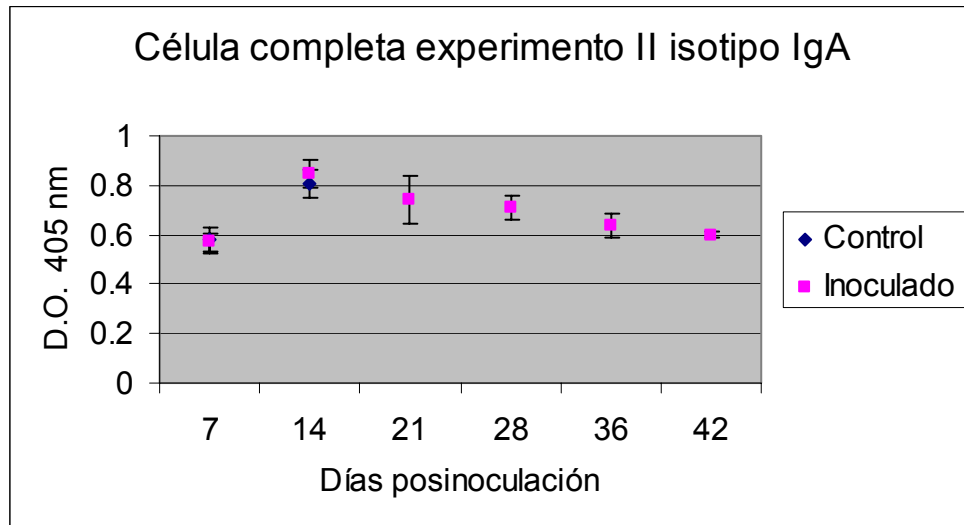


Figura 15. Medición del isotipo IgA mediante un ELISA indirecto del exudado nasal recolectado de los animales del experimento II, utilizando como antígeno de captura la célula completa lisada por calor. Observadose que no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre los animales infectados y los controles.

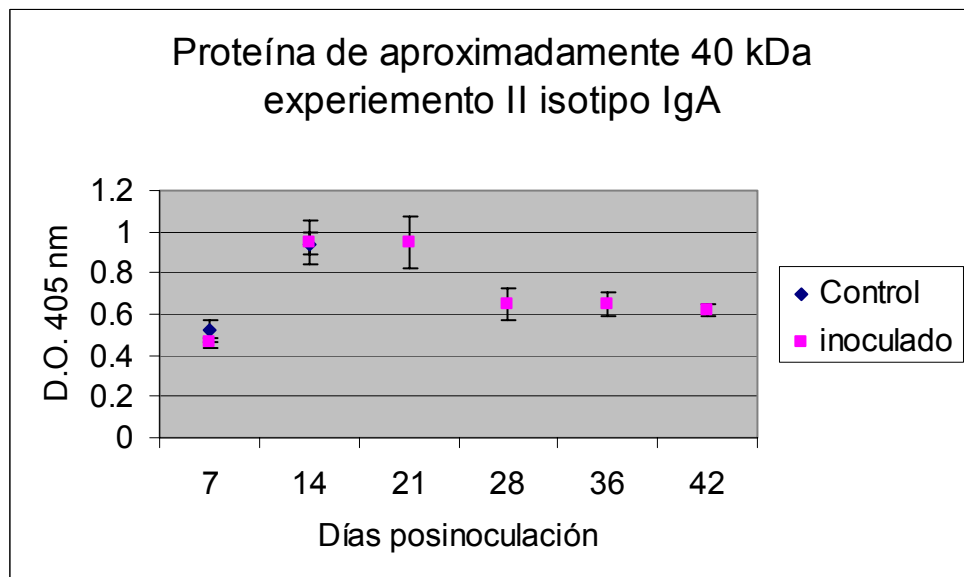


Figura 16. Medición del isotipo IgA mediante un ELISA indirecto del exudado nasal recolectado de los animales del experimento II, utilizando como antígeno de captura la proteína de aproximadamente 40 kDa. Observadose que no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre los animales infectados y los controles.

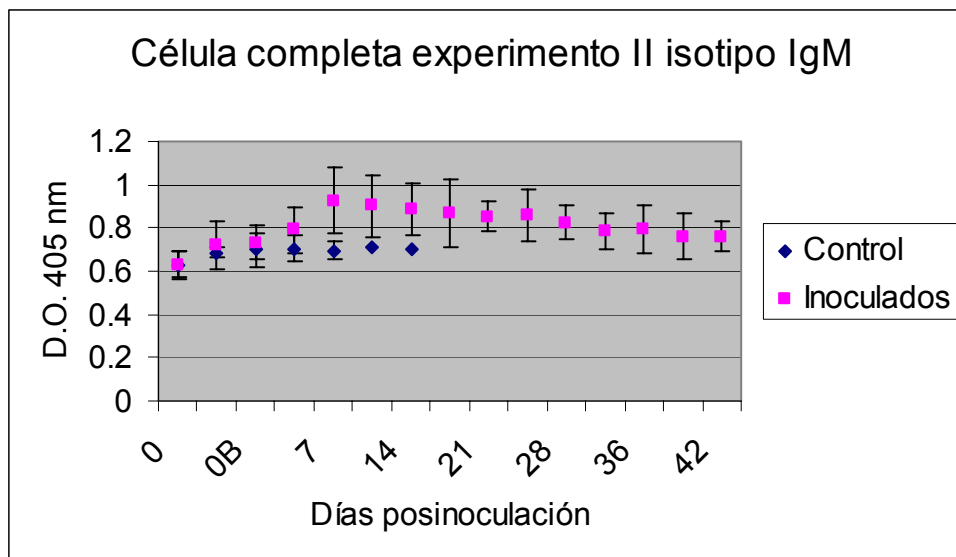


Figura 17. Medición del isotipo IgM mediante un ELISA indirecto de los sueros tomados del experimento II, utilizando como antígeno de captura la célula completa lisada por calor. Observadose que una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles el día 7 pos inoculación.

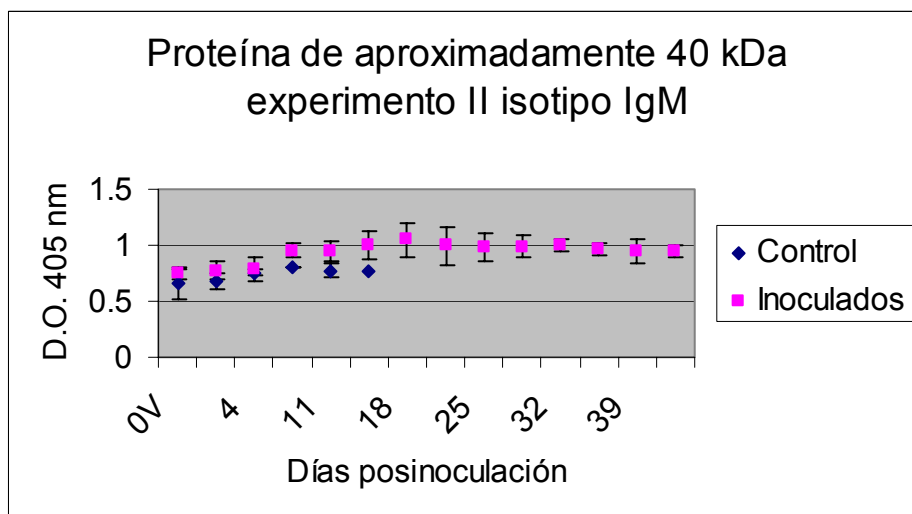


Figura 18. Medición del isotipo IgM mediante un ELISA indirecto de los sueros tomados del experimento II, utilizando como antígeno de captura la proteína de aproximadamente 40 kDa. Observadose que una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los animales infectados y los controles el día 7 y 11 posinoculación.

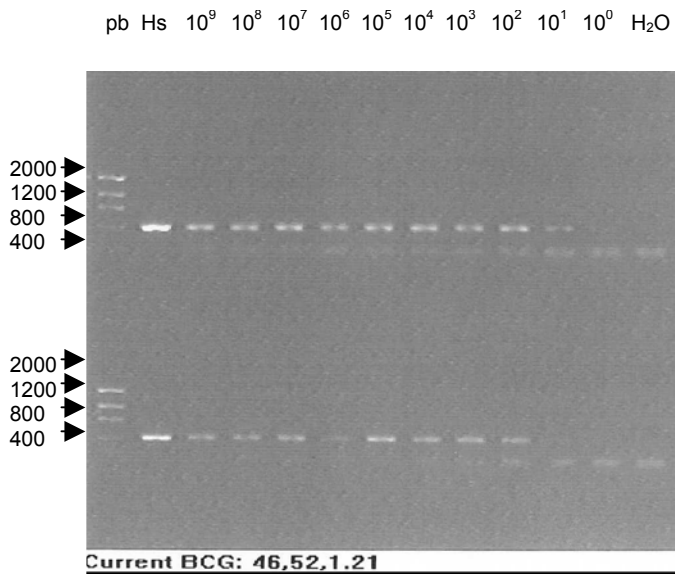


Figura 19. Sensibilidad PCR de *H. somni* a una Ta de 42°C en gel de agarosa al 1%

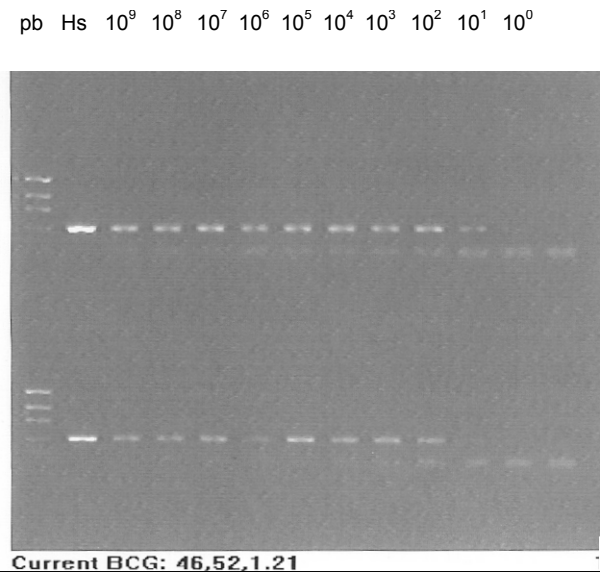


Figura 20. Sensibilidad PCR de *H. somni* a una Ta de 59.1°C en gel de agarosa al 1%

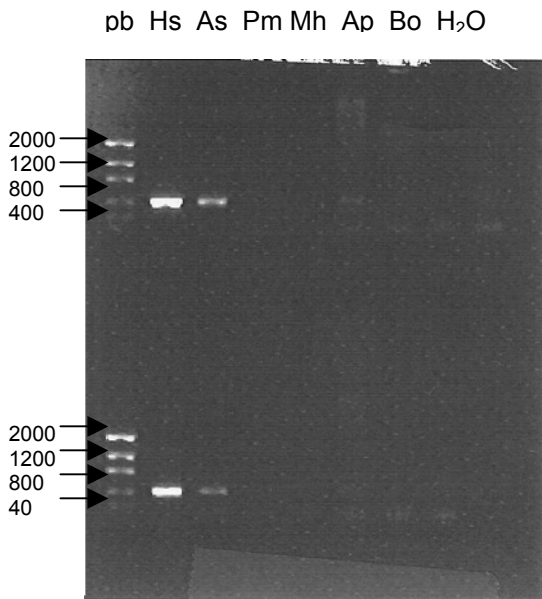


Figura 21. Gel de agarosa al 1% para observar la especificidad del PCR a una Ta de 42°C. Hs *Histophilus somni*, As *Actinobacillus seminis*, Pm *Pasteurella multocida*, Mh *Mannheimia haemolytica*, Ap *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Bo *Brucella ovis*

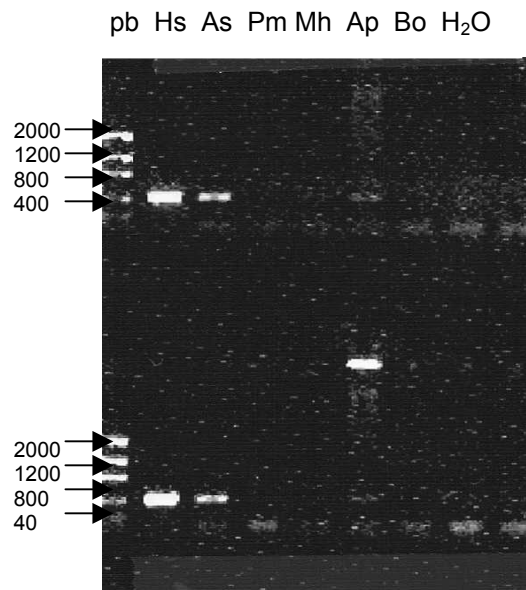
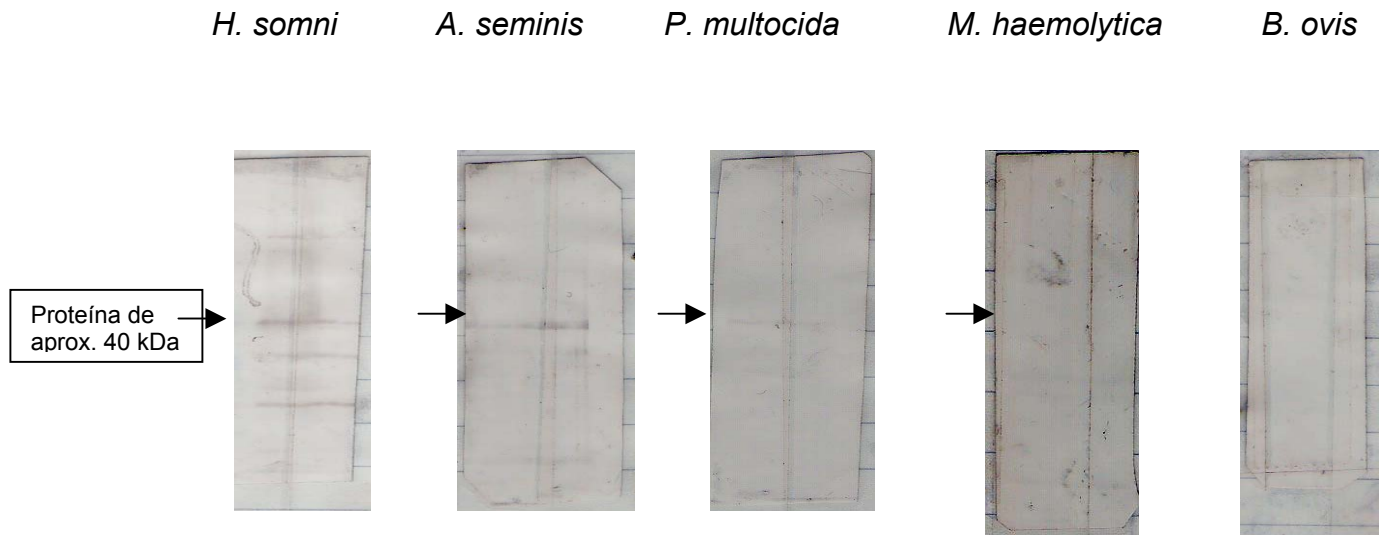


Figura 22. Gel de agarosa al 1% para observar la especificidad del PCR a una Ta de 59.1°C. Hs *Histophilus somni*, As *Actinobacillus seminis*, Pm *Pasteurella multocida*, Mh *Mannheimia haemolytica*, Ap *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Bo *Brucella ovis*

Figura 23. Membranas de nitrocelulosa de la realización de la inmunotransferencia.



Apéndice 2 CUADROS.

Densidad Óptica a 652 nm	Concentración de Albúmina µg/ml.
2.25	200
0.48	40
0.26	20
0.15	10
0.098	5
0.07	2.5
0.05	1.0
0.04	0.5

Cuadro 1. Curva de estandarización de la albúmina sérica bovina al medir la densidad óptica

	Grupo 1 Infectados	Grupo 2 infectados	Grupo Intratraqueal	3 control Intrauretral
Temperatura	37.5%	25%	-	-
Frecuencia cardiaca	87.5%	75%	12.5 %	-
Frecuencia respiratoria	25%	12.5%	-	-
Exudado nasal muco purulento	25 %	-	-	-
Tos	12.5%	-	-	-

Cuadro 2. Porcentaje de animales que presentaron alteraciones fisiológicas y manifestaciones clínicas en los dos grupos de animales desafiados y el grupo control del experimento I

Cuadro 3. Comparación de la presencia del isotipo IgG entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno célula completa de *H. somni*. Grupo 1.

	Días									
Animales	1	4	7	11	14	18	21	25	28	32
Control	0.617±0.064 ^a	0.638±0.040 ^a	0.636±0.072 ^a	0.641±0.016 ^a	0.651±0.052 ^a	0.718±0.048 ^a	0.735±0.084 ^a	0.704±0.020 ^a	0.653±0.61 ^a	0.675±0.042 ^a
Infectedos										
Grupo 1	1.295±0.118 ^b	1.250±0.234 ^b	1.320±0.287 ^b	1.560±0.270 ^b	1.635±0.287 ^b	1.618±0.263 ^b	1.764±0.367 ^b	1.672±0.224 ^b	1.496±0.276 ⁰	1.597±0.262 ^b

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 4. Comparación de la presencia del isotipo IgG entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 1.

	Días									
Animales	1	4	7	11	14	18	21	25	28	32
Control	0.561±0.013 ^a	0.535±0.048 ^a	0.561±0.010 ^a	0.512±0.003 ^a	0.506±0.042 ^a	0.552±0.011 ^a	0.559±0.035 ^a	0.601±0.028 ^a	0.632±0.023 ^a	0.622±0.046 ^a
Infectedos										
Grupo 1	1.143±0.157 ^b	1.150±0.204 ^b	1.141±0.190 ^b	1.128±0.169 ^b	1.120±0.168 ^b	1.195±0.158 ^b	1.256±0.184 ^b	1.288±0.142 ^b	1.182±0.174 ^b	1.146±0.193 ^b

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 5. Comparación entre días del isotipo IgG posterior a la inoculación utilizando como antígeno de célula completa de *H. somni*. Grupo 1.

Días	Animales controles	Animales inoculados
1	0.617 ± 0.064	1.295 ± 0.118
4	0.638 ± 0.040	1.250 ± 0.234
7	0.636 ± 0.072	1.320 ± 0.287
11	0.641 ± 0.016	1.560 ± 0.270
14	0.651 ± 0.052	1.635 ± 0.287
18	0.718 ± 0.048	1.618 ± 0.263
21	0.735 ± 0.084	1.764 ± 0.367
25	0.704 ± 0.020	1.672 ± 0.224
28	0.653 ± 0.061	1.496 ± 0.276
32	0.675 ± 0.042	1.597 ± 0.262

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 6. Comparación entre días del isotipo IgG posterior a la inoculación utilizando como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 1.

Días	Animales controles	Animales inoculados
1	0.561 ± 0.013	1.143 ± 0.157
4	0.535 ± 0.048	1.150 ± 0.204
7	0.561 ± 0.010	1.141 ± 0.190
11	0.512 ± 0.003	1.128 ± 0.169
14	0.506 ± 0.042	1.120 ± 0.168
18	0.552 ± 0.011	1.195 ± 0.158
21	0.559 ± 0.035	1.256 ± 0.184
25	0.601 ± 0.028	1.288 ± 0.142
28	0.653 ± 0.061	1.182 ± 0.174
32	0.675 ± 0.042	1.146 ± 0.193

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 7. Comparación de la presencia del isotipo IgG entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno célula completa de *H. somni*. Grupo 2.

	Días									
Animales	1	4	7	11	14	18	21	25	28	32
Control	0.683±0.007 ^a	0.632±0.085 ^a	0.635±0.026 ^a	0.698±0.080 ^a	0.726±0.048 ^a	0.799±0.122 ^a	0.752±0.015 ^a	0.861±0.008 ^a	0.782±0.047 ^a	0.781±0.063 ^a
Infectados										
Grupo 2	1.126±0.146 ^b	1.336±0.154 ^b	1.123±0.139 ^b	1.187±0.173 ^b	1.410±0.242 ^b	1.573±0.302 ^b	1.776±0.321 ^b	1.914±0.202 ^b	1.455±0.281 ^b	0.555±0.289 ^b

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 8. Comparación de la presencia del isotipo IgG entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 2.

	Días									
Animales	1	4	7	11	14	18	21	25	28	32
Control	0.620±0.110 ^a	0.573±0.035 ^a	0.595±0.049 ^a	0.584±0.024 ^a	0.513±0.016 ^a	0.624±0.085 ^a	0.591±0.042 ^a	0.659±0.104 ^a	0.683±0.100 ^a	0.678±0.103 ^a
Infectados										
Grupo 2	1.178±0.115 ^b	1.168±0.211 ^b	1.060±0.076 ^b	1.155±0.135 ^b	1.078±0.135 ^b	1.069±0.120 ^b	1.275±0.110 ^b	1.299±0.152 ^b	1.393±0.227 ^b	1.345±0.309 ^b

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 9. Comparación de la medición del isotipo IgG entre los días posteriores a la inoculación utilizando como antígeno de célula completa de *H. somni*. Grupo 2.

Días	Animales controles	Animales inoculados
1	0.683 ± 0.007	01.126 ± 0.146 ^a
4	0.632 ± 0.085	1.336 ± 0.154
7	0.635 ± 0.026	1.237 ± 0.139
11	0.698 ± 0.080	1.187 ± 0.173 ^a
14	0.726 ± 0.048	1.410 ± 0.242
18	0.799 ± 0.122	1.573 ± 0.302
21	0.752 ± 0.015	1.776 ± 0.321
25	0.861 ± 0.008	1.914 ± 0.202
28	0.782 ± 0.047	1.455 ± 0.281
32	0.781 ± 0.063	1.555 ± 0.289

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 10. Comparación de la medición del isotipo IgG entre los días posteriores a la inoculación utilizando como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 2.

Días	Animales controles	Animales inoculados
1	0.620 ± 0.110	1.178 ± 0.115
4	0.573 ± 0.035	1.168 ± 0.211
7	0.595 ± 0.049	1.060 ± 0.076
11	0.584 ± 0.024	1.155 ± 0.135
14	0.513 ± 0.016	1.078 ± 0.135
18	0.624 ± 0.085	1.069 ± 0.120 ^a
21	0.591 ± 0.042	1.275 ± 0.110
25	0.659 ± 0.104	1.299 ± 0.152
28	0.632 ± 0.023	1.393 ± 0.227
32	0.622 ± 0.046	1.345 ± 0.309

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 11. Comparación de la medición del isotipo IgA entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno célula completa de *H. somni*. Grupo 1.

	Días				
Animales	7	14	21	28	35
Control	0.663 \pm 0.011	0.619 \pm 0.042	0.7332 \pm 0.020	0.727 \pm 0.029	0.724 \pm 0.057
Inoculados					
Grupo 1	0.630 \pm 0.011	0.668 \pm 0.066	0.691 \pm 0.045	0.743 \pm 0.056	0.744 \pm 0.309

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 12. Comparación de la medición del isotipo IgA entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 1.

	Días				
Animales	7	14	21	28	35
Control	0.628 \pm 0.050	0.700 \pm 0.058	0.723 \pm 0.036	0.765 \pm 0.019	0.787 \pm 0.063
Inoculados					
Grupo 1	0.667 \pm 0.088	0.743 \pm 0.038	0.757 \pm 0.081	0.902 \pm 0.053	0.904 \pm 0.094

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 13. Comparación de la medición del isotipo IgA entre los días del grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno célula completa de *H. somni*.

	Días					
Animales	7	14	21	28	36	42
Control	0.577 \pm 0.053	0.806 \pm 0.000				
Infectados	0.571 \pm 0.036	0.846 \pm 0.057	0.739 \pm 0.096	0.709 \pm 0.047	0.637 \pm 0.048	0.598 \pm 0.012

^{a, b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 14. Comparación de la medición del isotipo IgA entre los días del grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*.

	Días					
Animales	7	14	21	28	36	42
Control	0.519 \pm 0.052 ^a	0.942 \pm 0.000				
Infectados	0.462 \pm 0.023 ^b	0.950 \pm 0.106	0.949 \pm 0.126	0.648 \pm 0.077	0.649 \pm 0.054	0.619 \pm 0.029

^{a, b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 15. Comparación de la presencia del isotipo IgM entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno célula completa de *H. somni*. Grupo 1.

Animales	Días									
	1	4	7	11	14	18	21	25	28	32
Controles	0.706±0.018 ^a	0.779±0.117	0.760±0.065 ^a	0.742±0.024 ^a	0.750 ± 0.019 ^a	0.738±0.028	0.722±0.035	0.690±0.005	0.642±0.026 ^a	0.601±0.006
Infectedos										
Grupo 1	0.816±0.077 ^b	0.919±0.088	0.908±0.087 ^b	0.885±0.090 ^b	0.861±0.066 ^b	0.834±0.208	0.791±0.131	0.783±0.090	0.769±0.090 ^b	0.687±0.075

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 16. Comparación de la presencia del isotipo IgM entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 1.

Animales	Días									
	1	4	7	11	14	18	21	25	28	32
Controles	0.717±0.079	0.787±0.085 ^a	0.799±0.098 ^a	0.717±0.042 ^a	0.801±0.021 ^a	0.751±0.077 ^a	0.790±0.088	0.782±0.056 ^a	0.790±0.070	0.758±0.059
Infectedos										
Grupo 1	0.872±0.072	0.997±0.085 ^b	0.930±0.062	0.916±0.141 ^b	0.887±0.063 ^b	0.898±0.069 ^b	0.897±0.073	0.895±0.072 ^b	0.868±0.070	0.793±0.060

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 17. Comparación entre días del isotipo IgM posterior a la inoculación utilizando como antígeno de célula completa de *H. somni*. Grupo 1.

Días	Animales controles	Animales inoculados
1	0.706 ± 0.018	0.816 ± 0.77 ^a
4	0.779 ± 0.117	0.919 ± 0.088
7	0.760 ± 0.065	0.908 ± 0.087
11	0.742 ± 0.024	0.885 ± 0.090
14	0.750 ± 0.019	0.861 ± 0.066
18	0.738 ± 0.028	0.834 ± 0.208
21	0.722 ± 0.035	0.791 ± 0.131
25	0.690 ± 0.005	0.783 ± 0.090
28	0.642 ± 0.026	0.769 ± 0.090
32	0.615 ± 0.018	0.699 ± 0.081

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 18. Comparación entre los días del isotipo IgM posterior a la inoculación utilizando como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 1.

Días	Animales controles	Animales inoculados
1	0.717 ± 0.084	0.875 ± 0.072 ^a
4	0.787 ± 0.076	0.997 ± 0.085
7	0.799 ± 0.098	0.930 ± 0.062
11	0.717 ± 0.042	0.916 ± 0.141
14	0.801 ± 0.021	0.887 ± 0.063
18	0.751 ± 0.077	0.898 ± 0.069
21	0.790 ± 0.088	0.897 ± 0.073
25	0.782 ± 0.056	0.895 ± 0.072
28	0.790 ± 0.070	0.868 ± 0.165
32	0.722 ± 0.065	0.831 ± 0.080

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 19. Comparación de la presencia del isotipo IgM entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno célula completa de *H. somni*. Grupo 2

	Días										
Animales	1	4	7	11	14	18	21	25	28	32	
Control	0.715±0.012 ^a	0.818±0.045 ^a	0.794±0.074 ^a	0.756±0.039	0.762±0.0007 ^a	0.733±0.033	0.726±0.185	0.728±0.206	0.702±0.004	0.674±0.011	
Infectados											
Grupo 2	0.884±0.097 ^b	1.092±0.184 ^b	0.935±0.048 ^b	0.868±0.118	0.856±0.044 ^b	0.819±0.064	0.815±0.058	0.755±0.064	0.773±0.068	0.699±0.042	

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 20. Comparación de la presencia del isotipo IgM entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 2.

	Días										
Animales	1	4	7	11	14	18	21	25	28	32	
Control	0.780±0.050	0.822±0.033 ^a	0.809±0.038 ^a	0.815±0.014	0.796±0.045 ^a	0.833±0.063	0.834±0.042 ^a	0.837±0.053 ^a	0.719±0.042	0.698±0.032	
Infectados											
Grupo 2	0.877±0.102	1.037±0.086 ^b	0.9839±0.076 ^b	0.912±0.077	0.916±0.068 ^b	0.933±0.097	0.917±0.039 ^b	0.916±0.050 ^b	0.880±0.096	0.807±0.087	

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 21. Comparación entre días del isotipo IgM posterior a la inoculación utilizando como antígeno de célula completa de *H. somni*. Grupo 2.

Días	Animales controles	Animales inoculados
1	0.715 ± 0.012	0.884 ± 0.097 ^a
4	0.818 ± 0.045	1.092 ± 0.184 ^a
7	0.794 ± 0.074	0.935 ± 0.048
11	0.756 ± 0.039	0.868 ± 0.118
14	0.762 ± 0.0007	0.856 ± 0.044
18	0.733 ± 0.033	0.819 ± 0.064
21	0.726 ± 0.185	0.815 ± 0.058
25	0.728 ± 0.206	0.755 ± 0.064
28	0.702 ± 0.004	0.773 ± 0.068
32	0.689 ± 0.007	0.715 ± 0.055

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 22. Comparación entre días del isotipo IgM posterior a la inoculación utilizando como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*. Grupo 2.

Días	Animales controles	Animales inoculados
1	0.780 ± 0.050	0.877 ± 0.102 ^a
4	0.822 ± 0.033	1.037 ± 0.086
7	0.809 ± 0.038	0.983 ± 0.076
11	0.815 ± 0.014	0.912 ± 0.077
14	0.796 ± 0.045	0.916 ± 0.068
18	0.833 ± 0.063	0.933 ± 0.097
21	0.834 ± 0.042	0.917 ± 0.039
25	0.837 ± 0.053	0.916 ± 0.050
28	0.819 ± 0.042	0.880 ± 0.096
32	0.785 ± 0.058	0.789 ± 0.075

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Constantes fisiológicas, signos clínicos	Virus PI3	Virus PI3 más <i>H. somnus</i>	Grupo Control
Temperatura	47%	23.5%	50%
Frecuencia cardíaca	76.4%	64.7%	50%
Frecuencia respiratoria	23.5%	45.2%	50%
Exudado nasal muco purulento	5%	-	-
Tos	-	-	-

Cuadro 23. Porcentaje de animales que presentaron alteraciones fisiológicas y manifestaciones clínicas al ser desafiados con PI3 y al inocula *H. somni* y el grupo control, del experimento II

Cuadro 24. Comparación de la presencia del isotipo IgG entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno célula completa de *H. somni*.

Animales	Días							
	0V	0B	4	7	11	14	18	21
Control	0.653±0.036 ^a	0.786±0.140 ^a	0.726±0.043 ^a	0.713±0.019 ^a	0.855±0.000	0.868±0.000		
Infectados	1.705±0.303 ^b	1.548±0.233 ^b	1.323±0.217 ^b	1.563±0.309 ^b	1.713±0.326	1.811±0.348	1.617±0.325	1.558±0.290

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

0V = Día cero previo a inoculación del virus P13

0B= Día cero previo a la infección con *H. somni*

Continuación cuadro 24

Animales	Días					
	25	28	32	36	39	42
Control						
Infectados	1.360±0.239	1.339±0.195	1.556±0.163	1.306±0.330	1.519±0.114	1.583±0.206

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 25. Comparación de la presencia del isotipo IgG entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*

Animales	Días							
	0V	0B	4	7	11	14	18	21
Control	0.633±0.037 ^a	0.660±0.045 ^a	0.602±0.025 ^a	0.661±0.072 ^a	0.613±0.000	0.626±0.000		
Infectados	1.054±0.211 ^b	1.227±0.238 ^b	1.274±0.098 ^b	1.338±0.176 ^b	1.188±0.203	1.181±0.162	1.103±0.151	1.136±0.082

Continuación cuadro 25

Animales	Días					
	25	28	32	36	39	42
Control						
Infectados	1.030±0.161	1.099±0.197	1.094±0.125	1.092±0.113	1.077±0.075	1.046±0.045

^{a, b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

0V = Día cero previo a inoculación del virus Pi3

0B= Día cero previo a la infección con *H. somni*

Cuadro 26. Comparación entre días del isotipo IgG posterior a la inoculación utilizando como antígeno de célula completa de *H. somni*.

Días	Animales controles	Animales inoculados
0V	0.653 ± 0.036	1.705 ± 0.303
0B	0.786 ± 0.140	1.548 ± 0.233 ^a
4	0.726 ± 0.043	1.323 ± 0.217 ^a
7	0.713 ± 0.019	1.563 ± 0.309 ^a
11	0.855 ± 0.000	1.713 ± 0.326
14	0.868 ± 0.000	1.811 ± 0.348
18		1.617 ± 0.325
21		1.558 ± 0.290 ^a
25		1.360 ± 0.239
28		1.339 ± 0.195 ^a
32		1.556 ± 0.163 ^a
36		1.306 ± 0.330 ^a
39		1.519 ± 0.114
42		1.583 ± 0.206

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

0V = Día cero previo a inoculación del virus Pi3

0B= Día cero previo a la infección con *H. somni*

Cuadro 27. Comparación entre días del isotipo IgG posterior a la inoculación utilizando como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*.

Días	Animales controles	Animales inoculados
0V	0.633 ± 0.037	1.054 ± 0.211 ^a
0B	0.660 ± 0.045	1.227 ± 0.238
4	0.602 ± 0.025	1.274 ± 0.098
7	0.661 ± 0.072	1.338 ± 0.176 ^a
11	0.613 ± 0.000	1.188 ± 0.203
14	0.626 ± 0.000	1.181 ± 0.162
18		1.103 ± 0.151
21		1.136 ± 0.082 ^a
25		1.030 ± 0.161
28		1.099 ± 0.197
32		1.094 ± 0.125
36		1.092 ± 0.113
39		1.077 ± 0.075
42		1.046 ± 0.045

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

0V = Día cero previo a inoculación del virus PI3

0B= Día cero previo a la infección con *H. somni*

Cuadro 28. Comparación entre días del isotipo IgA posterior a la inoculación utilizando como antígeno de célula completa de *H. somni*.

Días	Animales controles	Animales inoculados
7	0.577 ± 0.053	0.571 ± 0.036 ^a
14	0.806 ± 0.000	0.846 ± 0.057 ^a
21		0.739 ± 0.096
28		0.709 ± 0.047 ^a
36		0.637 ± 0.048 ^a
42		0.598 ± 0.012

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 29. Comparación entre días e del isotipo IgA posterior a la inoculación utilizando como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*.

Días	Animales controles	Animales inoculados
7	0.519 ± 0.052	0.462 ± 0.023 ^a
14	0.942 ± 0.000	0.950 ± 0.106
21		0.949 ± 0.126 ^a
28		0.648 ± 0.077
36		0.649 ± 0.054 ^a
42		0.619 ± 0.029

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 30. Comparación de la presencia del isotipo IgM entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno célula completa de *H. somni*.

Animales	Días							
	0V	0B	4	7	11	14	18	21
Control	0.685±0.023	0.697±0.078	0.705±0.061	0.694±0.042 ^a	0.7125±0.000	0.701±0.000		
Infectados	0.721±0.077	0.733±0.107	0.790±0.151	0.926±0.142 ^b	0.900±0.117	0.885±0.156	0.8646±0.070	0.851±0.121

^{a, b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

0V = Día cero previo a inoculación del virus Pi3

0B= Día cero previo a la infección con *H. somni*

Continuación cuadro 30

Animales	Días					
	25	28	32	36	39	42
Control						
Infectados	0.857±0.077	0.824±0.085	0.785±0.111	0.793±0.103	0.76 ±0.066	0.759±

^{a, b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 31. Comparación de la presencia del isotipo IgM entre el grupo control y el grupo infectado utilizando como antígeno proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*.

Animales	Días							
	0V	0B	4	7	11	14	18	21
Control	0.652±0.070 ^a	0.68±0.0232	0.757±0.003	0.799±0.056 ^a	0.775±0.000	0.769±0.000		
Infectados	0.753±0.083 ^b	0.774±0.110	0.786±0.062	0.953±0.086 ^b	0.950±0.127	1.000±0.155	1.045±0.164	0.993±0.123

^{a, b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

0V = Día cero previo a inoculación del virus Pi3

0B= Día cero previo a la infección con *H. somni*

Continuación cuadro 31

Animales	Días					
	25	28	32	36	39	42
Control						
Infectados	0.986±0.096	0.985±0.057	0.0997±0.057	0.964±0.103	0.945±0.052	0.947±0.021

^{a, b}. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 32. Comparación entre días del isotipo IgM posterior a la inoculación utilizando como antígeno de célula completa de *H. somni*.

Días	Animales controles	Animales inoculados
0V	0.685 ± 0.023	0.721 ± 0.077
0B	0.697 ± 0.078	0.733 ± 0.107
4	0.705 ± 0.061	0.790 ± 0.151
7	0.694 ± 0.042	0.926 ± 0.142
11	0.712 ± 0.000	0.900 ± 0.117
14	0.701 ± 0.000	0.885 ± 0.156
18		0.864 ± 0.070
21		0.851 ± 0.121
25		0.857 ± 0.077
28		0.824 ± 0.085
32		0.785 ± 0.111
36		0.793 ± 0.103
39		0.76 ± 0.066
42		0.759 ±

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

0V = Día cero previo a inoculación del virus Pi3

0B= Día cero previo a la infección con *H. somni*

Cuadro 33. Comparación entre días del isotipo IgM posterior a la inoculación utilizando como antígeno la proteína de aproximadamente 40 kDa de *H. somni*.

Días	Animales controles	Animales inoculados
0V	0.652 ± 0.070	0.753 ± 0.083
0B	0.68 ± 0.023	0.774 ± 0.110
4	0.757 ± 0.003	0.788 ± 0.062 ^a
7	0.799 ± 0.056	0.953 ± 0.086
11	0.775 ± 0.000	0.950 ± 0.127
14	0.756 ± 0.000	1.000 ± 0.155
18		1.045 ± 0.164
21		0.993 ± 0.123
25		0.986 ± 0.096
28		0.985 ± 0.057
32		0.997 ± 0.056
36		0.964 ± 0.103
39		0.945 ± 0.052
42		0.947 ± 0.021

^a. Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

0V = Día cero previo a inoculación del virus Pi3

0B= Día cero previo a la infección con *H. somni*