



Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

**Doctorado en Ciencias de la Producción y de
la Salud Animal**

**“Evaluación y caracterización de microvesículas
(MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2
para su posible utilización como vacuna en
ovinos”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
CYNTHIA GONZÁLEZ RUÍZ.**

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Víctor R. Tenorio Gutiérrez

Dra. G. Mireya de la Garza Amaya

Dr. Francisco J. Trigo Tavera



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

Página

Índice de esquemas, cuadros y figuras	I
Resumen	II
Abstract	III
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	2
I.2 <i>Mannheimia haemolytica</i>	2
I.3 Flora normal del Aparato Respiratorio	4
I.4 Mecanismos de defensa del Aparato Respiratorio	4
I.5 Mecanismos de resistencia Inmune del Aparato Respiratorio a la infección.....	7
I.6 Patogenia de la Mannheimiosis Neumónica (Pasteurelisis Neumónica)	10
I.7 Factores predisponentes	10
I.8 Interacción virus-bacteria.....	11
I.9 Lesiones neumónicas ocasionadas por <i>M. haemolytica</i>	12
I.10 Proteínas de Membrana Externa y su papel como inmunógenos ...	14
I.11 Microvesículas (MVs)	17
I.9 Vacunación	22
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVO GENERAL	25
V. OBJETIVOS PARTICULARES	25
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	26
VI.1 FASE DE EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i>	29
VI.1.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	29
VI.2 Obtención de microvesículas (MVs).....	29
VI.3 Cinética de obtención de MVs.....	30
VI.4 Obtención y cuantificación de proteínas de membrana externa de <i>M. haemolytica</i>	30
VI.5 Purificación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos	31
VI.6 Cuantificación de proteínas	32
VI.7 Preparación de la muestra para el corrimiento electroforético.....	32
VI.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS - PAGE).....	32
VI.9 Tinción de plata para proteínas.....	33
VI.10 Tinción de plata para LPS.....	33
VI.11 Microscopía Electrónica de transmisión	34
VI.12 Eliminación de plásmidos bacterianos.....	34
VI.13 Extracción de DNA plasmídico.....	35
VI.14 Western Blot (Inmunotransferencia).....	36

VI.15 FASE DE EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> (DESAFÍO EXPERIMENTAL).....	36
VI.15.1 Preparación del inóculo de MVS de <i>M. haemolytica</i> A2.....	36
VI.16 Fase de inmunización.....	37
VI.17 FASE DE DESAFÍO	39
VI.17.1 Desafío viral.....	39
VI.17.2 Desafío bacteriano.....	39
VI.17.2.1 Estandarización del inóculo bacteriano	39
VI.18 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	42
VI.18.1 Procesamiento histológico.....	42
VI.19 Adsorción del suero	42
VI.20 PRUEBA DE ELISA INDIRECTA.....	43
VI. 21 Análisis Estadístico.....	43
VII. RESULTADOS	44
VII.1 Caracterización de antígenos de MVs: Evaluación <i>in Vitro</i>	44
VII.2 SDS-PAGE. (Cinética de obtención de MVs)	45
VII.3 SDS-PAGE	47
VII.4 Western Blot (Inmunotransferencia)	50
VII.5 Eliminación del plásmido.....	53
VII.6 Microscopía Electrónica.....	54
VII.7 ELISA INDIRECTA	55
VII.8 Resultados de la evaluación al sacrificio	65
VII.8.1 Necropsia.....	65
VII.8.2 Histopatología	69
VIII. DISCUSIÓN	72
IX. CONCLUSIONES	86
X. LITERATURA CITADA.....	87

II. RESUMEN

La Pasteurelisis Neumónica es una enfermedad que afecta a rumiantes en general, la morbilidad y mortalidad que ocasiona en el ganado es un problema desafiante y persistente. Actualmente, no se ha podido controlar ni prevenir totalmente esta enfermedad, debido a que no se ha logrado entender del todo su patogenia, así como tampoco se ha obtenido un biológico eficaz. La Mannheimiosis Neumónica (Pasteurelisis Neumónica) es una enfermedad de etiología multifactorial e involucra una combinación de estrés, factores ambientales y agentes infecciosos. Sin embargo, *Mannheimia haemolytica* es el principal agente microbiano causal de la pleurobronconeumonía fibrinosa severa desarrollada en los animales afectados por esta enfermedad. Muchas bacterias Gram (-) producen microvesículas de membrana externa durante su fase de crecimiento normal. Durante su formación, las microvesículas engloban una gran cantidad de componentes considerados importantes factores de virulencia. *M. haemolytica* elimina múltiples proteínas de interés inmunogénico, contenidas en estas microvesículas, liberadas una vez que se le somete a estrés, por lo que la capacidad inmunogénica de éstas, será capaz de despertar una adecuada respuesta inmune humoral, que evite que los individuos que se expongan a las cepas de campo, desarrollen cuadros patológicos característicos de la enfermedad. El objetivo principal de este trabajo fue obtener y caracterizar a las microvesículas de *M. haemolytica* serotipo A2 (cepa de campo) y evaluar la respuesta inmune desarrollada por ovinos inoculados con ellas, para proponer su utilización como biológico. Se identificaron en *M. haemolytica* serotipo A1 (cepa de referencia) y A2 (cepa virulenta de campo), microvesículas de membrana externa, en las cuales se caracterizaron los principales antígenos de la bacteria: leucotoxina, lipopolisacárido, proteínas de membrana externa (PME) y una fracción de DNA, mediante diferentes técnicas de tinción, inmunodetección y moleculares. Posteriormente se inmunizaron 40 corderos divididos en 5 grupos, a los que se les inoculó: Grupo A (Vacuna comercial / I.M.), Grupo B (MVs / I.N.), Grupo C (SSF / I.M.), Grupo D (MVs / I.M.) y Grupo E (PME / I.M.), al día 37 de acuerdo al calendario de inmunización se desafiaron los cinco grupos con PI3 por vía endotraqueal y a los 8 días después se desafió con una cepa virulenta de campo de *M. haemolytica* A2 por la misma vía. Finalmente se obtuvieron sueros de estos animales para su evaluación de los niveles de IgG e IgM mediante ELISA Indirecta. Se establecieron títulos basales en el primer muestreo, dado que los ovinos convencionales no son animales libres de *M. haemolytica*. Los títulos de IgG y de IgM a partir del quinto muestreo fueron significativamente diferentes con respecto a los basales ($P < 0.05$), permaneciendo así hasta el final del experimento, demostrando de esta manera la capacidad inmunogénica de las microvesículas para elevar la respuesta inmune humoral. Posteriormente se evaluaron macroscópicamente y microscópicamente las lesiones encontradas en los ovinos al sacrificio. El Grupo A y el Grupo D, desarrollaron únicamente neumonías intersticiales. Lo cual sugiere que las microvesículas de *M. haemolytica* A2, protegieron contra el desarrollo de lesiones neumónicas características de la enfermedad. Los altos títulos de anticuerpos observados en los animales vacunados con microvesículas por vía I.N., así como los vacunados con PME por vía I.M., no necesariamente resultaron en una buena protección contra el desarrollo de lesiones. La mejor vía de inmunización con microvesículas de *M. haemolytica* fue la intramuscular, ya que los animales vacunados por esta vía no desarrollaron lesiones significativas o características de la enfermedad. Las microvesículas son inmunógenos muy completos que despiertan una respuesta inmune humoral y pueden proteger contra el desarrollo de lesiones a nivel pulmonar, características de la enfermedad a nivel de campo en ovinos.

Palabras claves: *Mannheimia haemolytica*, neumonía, microvesículas, ovinos

III. ABSTRACT

Pneumonic Pasteurellosis is a disease that mainly affects ruminants, the morbidity and mortality that it causes in the cattle is a challenging and constant problem. At the moment, it has neither been possible to control nor to prevent this disease, since its pathogenicity has not been totally understood, and there is not an effective vaccine. *Mannheimia haemolytica* is the main causal microbial agent of the severe fibrinous pleurobronchopneumonia developed in animals affected by this disease. Many Gram (-) bacteria produce external membrane microvesicles during the normal growth. During their formation, the microvesicles include a lot of components, all considered important factors of virulence. *M. haemolytica* eliminates multiple proteins of immunogenic interest, contained in these microvesicles, released under stress conditions, and by this reason they should be able to begin a suitable humoral immune response, avoiding the develop of pathological changes, characteristic of the disease in the animals exposed to field strains. The main objective of the present study was to obtain and characterize the microvesicles of *M. haemolytica* serotype A2 (field strain), and to evaluate the immune response developed by sheep inoculated with them, and propose its use as a vaccine. Microvesicles were identified in *M. haemolytica* serotype A1 (reference strain) and A2 (field virulent strain), in which the main bacterial antigens were characterized: leucotoxin, lipopolysaccharide, external membrane proteins (PME) and a fraction of DNA, by different staining, immunodetection and molecular techniques. Later, 40 lambs were assigned in 5 groups and inoculated as follows: Group A (comercial vaccine/I.M.), Group B (MVs/I.N.), Group C (FSS/I.M.), Group D (MVs/I.M.) and Group E (PME/I.M.), at 37th day, according to the immunization calendar, all groups were challenged with PI3 (endotracheal route) and 8 days later, all groups were challenged with a *M. haemolytica* A2 virulent strain (same route). Finally, sera samples were obtained from the animals to evaluate IgG and IgM levels, by indirect ELISA. Basal titles in the first sampling settled down, since the conventional sheep is not free of *M. haemolytica*. The IgG and IgM titles from the fifth sampling and on, were significantly different, respect to the basal ones ($P < 0.05$), thus remaining until the end of the experiment, demonstrating the microvesicles immunogenic capacity to elevate the humoral immune response. Later, the lung damage found in the animals was macroscopically (at slaughter) and microscopically evaluated. Group A and Group D, developed only interstitial pneumonia, suggesting that *M. haemolytica* A2 microvesicles protected against the development of pneumonic damage, characteristic of the disease. The high titles of antibodies observed in the animals vaccinated with microvesicles by I.N. route, as well as the vaccinated ones with PME by I.M. route, not necessarily protected against the damage development in the disease. The best immunization route with microvesicles *M. haemolytica* was the intramuscular one, since the animals vaccinated by this route did not develop significant pneumonic damage or other characteristics of the disease. Microvesicles are very complete immunogens, which can begin a humoral immune response and can protect against the development of pneumonic damage, suggestive of the disease at field level in sheep.

Key words: *Mannheimia haemolytica*, pneumonia, microvesicles, sheep.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes.

Las neumonías, a través del mundo, son la principal causa de muerte en ovinos y bovinos ocasionando importantes pérdidas económicas en la industria del ganado. Tan solo en América del Norte, se pierden un billón de dólares anualmente y en otras partes del mundo, aproximadamente un 30% del total del ganado global muere por esta causa. Las pérdidas económicas incluyen no tan solo la muerte de los animales, sino también disminución en ganancias de peso, menor eficiencia en la conversión alimenticia y costos elevados del tratamiento en animales afectados con neumonía crónica, entre otros ¹.

Estudios realizados en México destacan la importancia de las neumonías en becerros, ya que clínicamente la incidencia y prevalencia alcanzan hasta un 24% en la etapa de lactancia ². Otros estudios sobre mortalidad de corderos han determinado que la muerte asociada a neumonías puede rebasar el 20%. En estos trabajos se ha demostrado que el mayor porcentaje de mortalidad por problemas neumónicos se acentúa entre los dos y tres meses de edad ^{3,4}.

Los datos sobre prevalencia de neumonías varían según el país de procedencia, tipos de explotación, edad de los animales y época del año en que se realiza el estudio. Las tasas promedio de incidencia en corderos varían del 10 al 40%, tanto en México como en el extranjero. Sin embargo, los valores obtenidos en estudios de Centros de Diagnóstico son más bajos que los de rastro ⁵.

La pasteurelisis neumónica bovina fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1915 y en 1921, se aisló el germen de rumiantes posteriormente en el Reino Unido se reportó hasta 1925 ⁶. Para 1932 se propuso el nombre de *Pasteurella haemolytica* ⁷. La morbilidad que ocasiona la pasteurelisis neumónica bovina en el ganado es un problema desafiante y persistente. Actualmente, no se ha podido controlar ni prevenir totalmente esta enfermedad, debido a que no se ha logrado entender completamente su patogenia ⁸.

Esta enfermedad es multifactorial e involucra una combinación de estrés, factores ambientales y agentes infecciosos. La etiología, epidemiología y lesiones han sido bien estudiadas y es generalmente aceptado que *Mannheimia haemolytica* es el principal agente microbiano asociado a problemas neumónicos de rumiantes ⁹ y de la pleurobronconeumonía fibrinosa severa, lesión característica de la enfermedad ¹⁰⁻¹².

I.2 *Mannheimia haemolytica*.

M. haemolytica es una bacteria gram negativa de forma cocobacilar (1 a 3 μm de diámetro), inmóvil, encapsulada, oxidasa positiva, indol negativa, aerobia y anaerobia facultativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas; es negativa a las pruebas de rojo de metilo, gelatinasa y Voges Proskauer. Crece en agar Mc Conkey, en medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre produciendo hemólisis completa y formando colonias de color blanco grisáceo. La presencia de cápsula con determinantes de superficie antifagocíticos la hacen parcialmente resistente a la fagocitosis¹³.

De *M. haemolytica* se han reconocido, por hemaglutinación indirecta, 17 serotipos de acuerdo a antígenos capsulares solubles ^{14, 15}. Estos antígenos son básicamente polisacáridos y lipopolisacáridos con alta capacidad antigénica ¹⁶. Se han identificado también dos diferentes biotipos de *M. haemolytica*, de acuerdo a diferencias en la fermentación de azúcares ¹⁷. El biotipo T fermenta trealosa e incluye a los serotipos 3, 4, 10 y 15, causantes de septicemia. Los serotipos restantes corresponden al biotipo A que fermenta principalmente arabinosa y los cuales están asociados a la producción de neumonía ¹⁸.

Las cepas de *Pasteurella haemolytica* negativas a la trealosa han sido recientemente reclasificadas a un nuevo género denominado *Mannheimia*. Este género consiste en cinco especies establecidas en cambios con base en una extensiva investigación utilizando la evaluación cuantitativa de datos fenotípicos, rehibridización, electroforesis enzimática de multiloci, secuenciación de rDNA 16S e hibridación de DNA-DNA. 1.- *M. haemolytica* (contenida en cepas de referencia de los serotipos 1, 2, 5 - 9, 12 - 14 y 16 en su mayoría biotipo A, siendo todos fermentadores de L-arabinosa. Solamente fueron las cepas aisladas de rumiantes las que mostraron identidad genética a *M. haemolytica* 2.- *M. glucosida* que incluye al serotipo A11. Esta

especie es fenotípicamente heterogénea, aunque todas las cepas mostraron actividad a la β -glucosidasa. La mayoría de ellas se aislaron de cavidad nasal de borrego e incluso algunas cepas se recuperaron de animales con neumonía o en otras condiciones de enfermedad. 3.- *M. granulomatis*, aislada de ganado bovino y especies lepóridas, esta cepa han sido asociada con neumonía y conjuntivitis purulenta en lepóridos y con granulomas en piel, así como otras condiciones de enfermedad en el ganado. 4.- *M. ruminalis* consiste de cepas no hemolíticas aisladas del rumen de ganado bovino y ovino, a las cuales no se les asocia a condiciones de enfermedad y 5.- *M. varigena*, aislada de bovinos y porcinos, la cual ha sido asociada con sepsis, neumonía y otros estados de enfermedad ¹⁹.

El serotipo A1 es el más comúnmente aislado de casos clínicos de pasteurelosis neumónica bovina. En ovinos el serotipo más importante a nivel de mucosa respiratoria es el A2; sin embargo, se han reconocido los 17 serotipos como patógenos y representan el 90% de los aislamientos. El otro 10% permanece como no tipificable y se duda de su patogenicidad ²⁰. Los estudios realizados en México han demostrado la mayor importancia de los serotipos A1, A2, A5 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos ²¹.

Jaramillo, et. al. en 2007, realizaron un estudio de prevalencia de serotipos recuperados a partir de *M. haemolytica* aislada de exudado nasal de bovinos con neumonía (n= 189) y clínicamente sanos (n=1902) en ranchos del norte y centro de México, para establecer la prevalencia de los serotipos aislados. Los aislamientos y serotipificaciones por hemoaglutinación indirecta con antisueros de referencia se compusieron de 48% del serotipo A1, 2.4% del serotipo A6 y 49.3% fueron no tipificables. Los índices de prevalencia de *M. haemolytica* fueron significativamente más altos en bovinos enfermos, así como en bovinos jóvenes de menos de 1 año de edad ²².

Algunos serotipos de *M. haemolytica* forman parte de la microbiota normal de la cavidad nasofaríngea de los rumiantes, pero bajo situaciones que alteran los mecanismos de defensa pulmonar del hospedador logran establecerse en el aparato respiratorio bajo y causan daño al tejido pulmonar. En la presentación de la enfermedad intervienen diversos factores predisponentes, que son determinantes en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo, las condiciones ambientales adversas y la

mala alimentación de los animales pueden favorecer al complejo respiratorio ²³. También se ha demostrado la participación de agentes primarios de tipo viral como adenovirus, virus respiratorio sincicial y parainfluenza 3, capaces de iniciar la enfermedad ^{24, 25}.

I.3 Flora normal del Aparato Respiratorio.

Como cualquier otra membrana mucosa que está en contacto directo con el medio ambiente, el aparato respiratorio tiene su propia flora bacteriana. Pero la flora respiratoria está restringida únicamente a la porción proximal del sistema de conducción (cavidad nasal, nasofaringe y laringe) mientras que las porciones distales del sistema de conducción (tráquea y bronquios), el sistema de transición (bronquiolos) y el sistema de intercambio (alvéolos) son membranas esencialmente estériles ²⁶⁻²⁸.

Los tipos de bacterias (aerobias y anaerobias) presentes en la flora nasal varían considerablemente en las especies animales, así como también, varían de acuerdo al medio ambiente en el que se crían los animales. Es importante destacar que ciertas bacterias de la flora normal son capaces de producir severas infecciones respiratorias ²⁶⁻²⁸.

Estudios experimentales en animales domésticos y de laboratorio han demostrado que las bacterias de la flora nasal son acarreadas constantemente a los pulmones en el aire inspirado. Los pulmones permanecen estériles gracias a sus eficientes mecanismos de defensa a pesar de este constante acarreo de bacterias en el aire inspirado ²⁶⁻²⁸.

I.4 Mecanismos de defensa del Aparato Respiratorio.

El sistema respiratorio está en constantemente relación por partículas (microorganismos, polvo, fibras), gases tóxicos (SO₂, NO₂, H₂S, ozono) y vapores (amoníaco, formaldehído, acetona, gasolina). En condiciones normales, los gases inhalados son destoxificados, las toxinas son neutralizadas; las partículas son atrapadas y eliminadas, y los microorganismos son atrapados y eliminados. Cada región anatómica-histológica del aparato respiratorio tiene su propio mecanismo de

defensa. En otras palabras, el sistema de conducción (de nariz a bronquios), sistema de transición (bronquiolos) y sistema de intercambio (alvéolos) tiene cada uno un mecanismo diferente de defensa ²⁶⁻²⁸.

- Sistema de Conducción (Conchas nasales, traquea, bronquios). El aparato mucociliar es el principal mecanismo de defensa del sistema de conducción, que incluye desde las fosas nasales hasta los bronquios. Todas estas estructuras están recubiertas por el llamado aparato mucociliar. Este aparato está formado por el epitelio pseudo-estratificado ciliar y las secreciones de las células caliciformes (moco). Cada célula ciliar del sistema de conducción tiene alrededor de 250 cilios los cuales producen alrededor de mil pulsaciones por minuto (1,000/minuto) con un movimiento longitudinal promedio de 20 mm por minuto. Existen mecanismos auxiliares que facilitan el atrapamiento de partículas, vapores y gases por el aparato mucociliar. Por ejemplo, la generación de turbulencias de aire dentro de la cavidad nasal hace que las partículas mayores de 10 μm sean atrapadas en el moco que recubre las conchas (cornetes) nasales. Las partículas de tamaño entre 3-10 μm son atrapadas principalmente en las bifurcaciones de los bronquios en donde se originan fuerzas centrífugas en el aire inspirado al cambiar su dirección súbitamente. En síntesis, las partículas suspendidas en el aire de un tamaño de 3-10 μm son atrapadas en el moco del aparato mucociliar (deposición) y de aquí son rápidamente eliminadas por el movimiento del moco hacia la faringe en donde son finalmente deglutidas. La IgA es la inmunoglobulina más abundante en el moco y una de sus funciones principales es inhibir la adherencia de patógenos a las células ciliadas ²⁶⁻²⁸.

- Sistema de transición (bronquiolos). Sólo aquellas partículas de tamaño menor a las dos micras ($<2\mu$) logran penetrar hasta los bronquiolos y alvéolos. En estas regiones profundas del pulmón, las partículas pequeñas se depositan en la membrana respiratoria mediante sedimentación o movimiento browniano. Los mecanismos de defensa de los bronquiolos son una combinación de los encontrados en los sistemas de conducción y de intercambio, mas secreciones locales principalmente producidas por las llamadas células Clara ²⁶⁻²⁸.

- Sistema de intercambio (alvéolos). Los alvéolos carecen de cilios y moco por lo que en esta región pulmonar tiene un mecanismo de defensa especializado para protegerse de las partículas y patógenos inhalados. El principal mecanismo de defensa en el

alveolo lo constituyen los macrófagos alveolares. Estas células fagocíticas se originan en la médula ósea de donde pasan a la sangre como monocitos sanguíneos, para después llegar al pulmón en donde permanecen un tiempo de "maduración" en el intersticio pulmonar. Durante el tránsito en el intersticio pulmonar adquieren la capacidad de fagocitar en un medio aeróbico. El número de macrófagos alveolares es proporcional al número de partículas respirables que llegan al pulmón; o sea que en un animal expuesto a un número más alto de partículas tendrá mayor número de macrófagos en los alvéolos. Las IgG e IgM son las inmunoglobulinas preponderantes en las secreciones alveolares y estos anticuerpos juegan un papel importante en la opsonización y fagocitosis por macrófagos alveolares. Las secreciones alveolares, particularmente el surfactante producido por los neumocitos tipo II, también contienen sustancias que favorecen la fagocitosis y actúan como antioxidantes para prevenir el daño celular causado por el estrés oxidativo ²⁶⁻²⁸.

En conjunto, los mecanismos de defensa del aparato respiratorio son extremadamente eficientes en atrapar, destruir, eliminar, detoxificar agentes patógenos y gases tóxicos. Sin embargo, cuando estos mecanismos de defensa son deprimidos, las bacterias inhaladas colonizan fácilmente el pulmón causando infecciones respiratorias. De la misma manera, cuando gases, vapores o partículas tóxicas y agentes oxidantes sobrepasan los mecanismos de defensa, las células pulmonares son fácilmente dañadas causando considerables alteraciones pulmonares ²⁶⁻²⁸.

Entre los factores externos que más frecuentes que inhiben los mecanismos de defensa figuran las infecciones virales, el edema pulmonar, uremia, amoníaco, deshidratación, temperatura, humedad y estrés entre otros muchos ²⁶⁻²⁸.

I.5 Mecanismos de resistencia Inmune del Aparato Respiratorio a la infección.

La respuesta inmune del rumiante contra esta bacteria se lleva a cabo mediante los mecanismos de inmunidad celular y a través de la inmunidad humoral. Con respecto a la primera, los linfocitos T pueden ser directamente tóxicos a la bacteria por medio de la activación de macrófagos inducida por citocinas al incrementar la destrucción intracelular de las mismas. Por otro lado, se encuentra la acción protectora de las IgA que inhiben la colonización bacteriana en la mucosa

respiratoria. En la Mannheimiosis Neumónica (Pasteurelosis Neumónica) la inhibición de la colonización del aparato respiratorio superior mediante la acción de la IgA, no ha sido estudiada a detalle ²⁹.

La actividad del aparato mucociliar reduce la habilidad de los microbios de adherirse y proliferar en los pasajes aéreos del tracto respiratorio. La secreción de mucina y fluidos serosos en esta áreas contienen factores que inhiben la actividad bacteriana. Estos incluyen: lactoferrina, lisosima, proteínas surfactantes, fosfolipasa A2, inhibidor de leucoproteasa secretora, peroxidasa, serprocidinas, catelicidinas, defensinas y péptidos aniónicos. Estas sustancias se ven incrementadas aparentemente en células epiteliales de bronquios y bronquiolos en respuesta a productos de bacterias Gram – negativas incluyendo *M. haemolytica* ³⁰.

La inmunidad innata es importante para prevenir las infecciones microbianas en el tracto respiratorio, poco después del nacimiento, cuando las mucosas son inicialmente expuestas a una gran variedad de agentes infecciosos. Las células epiteliales respiratorias producen al menos dos principales péptidos antimicrobianos antes y durante la neumonía producida por *M. haemolytica* en el ganado ³¹.

Los péptidos antimicrobianos (AMP) están comenzando a reconocerse como importantes componentes en las defensas de la inmunidad innata del hospedador. El péptido antimicrobiano traqueal (TAP) fue el primer péptido derivado de células epiteliales encontrado en mamíferos y fue subsecuentemente caracterizado como β -defensina con propiedades inductivas. Se ha detectado mediante mRNA en células columnares de tráquea y bronquios de bovinos adultos; sin embargo, la expresión de TAP no esta presente en fetos de bovinos y en pulmones de neonato no ha sido determinada ³².

Una región promotora de TAP contiene motivos de un factor nuclear κ B (NF- κ B) la transcripción de éste factor media la inducción de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria ³³. Experimentos con cultivos de células epiteliales de tráquea han demostrado que NF- κ B regula la expresión de TAP en respuesta al lipopolisacárido. NF- κ B induce la expresión de interleucina 1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 8 (IL-8) en macrófagos alveolares de bovino expuestos a la LKT y al LPS de *M. haemolytica* ³⁴.

M. haemolytica induce además un péptido antimicrobiano lingual (LAP) en bovinos mayores de tres semanas de edad ³⁵. Esta bacteria inicia una severa respuesta inflamatoria en el pulmón de los rumiantes caracterizada por un importante infiltrado de neutrófilos. El daño mediado por neutrófilos puede ayudar y puede destruir la barrera protectora que provee la inmunidad innata en la mucosa respiratoria. La inhibición de la transmigración de neutrófilos reduce la severidad de las lesiones que caracterizan a esta enfermedad e incluso podría preservar la actividad del sistema inmune innato ³⁶⁻³⁹.

Un potente mediador inflamatorio en la neumonía por *M. haemolytica* en rumiantes es la citocina IL-8. La cual es producida por células endoteliales, células epiteliales, macrófagos activados y neutrófilos, causando la activación y quimiotaxis de éstos últimos al sitio de lesión ⁴⁰. La producción de IL-8 es inducida por otras citocinas, IL-1 y TNF- α siendo éstas dos las citocinas más potentes involucradas en el proceso. Los neutrófilos también liberan elastasa el cual induce la síntesis de IL-8 en células del epitelio bronquial. Estas citocinas inducen importantes estados procoagulantes que resultan en excesiva polimeración de fibrina. Otros mediadores inflamatorios liberados en el pulmón en respuesta a la LKT y LPS de *M. haemolytica* durante la neumonía incluyen leucotrieno B₄, histamina y prostaglandinas E₂ ⁴¹.

Las moléculas de adhesión que incluyen selectinas (L-, E-, y P- selectina) y moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) son también parte integral a la respuesta inflamatoria inducida en la neumonía por *M. haemolytica*. Las selectinas median el tránsito y la adherencia de neutrófilos en las células endoteliales vasculares, mientras que el ICAM-1 interactúa con las β_2 - integrinas mediando una mayor estabilidad en este tipo de adherencia. La transmigración de neutrófilos en el tejido pulmonar se puede reducir en bovinos neonatos durante la neumonía por *M. haemolytica* con la molécula de inhibición de la adhesión a la selectina, la TBC1269. La TBC1269 también disminuye los neutrófilos que inducen daño pulmonar. El TBC1269 es un monoligosacárido antagonista a selectina el cual provee una inhibición competitiva a las selectinas ^{42, 43}.

Otro mecanismo inmunológico de protección contra *M. haemolytica* es la opsonización de la bacteria por anticuerpos específicos del suero y de las secreciones

respiratorias como IgG e IgM, que facilitan el proceso de fagocitosis por los macrófagos alveolares y de los neutrófilos. Otra forma importante de eliminar a la bacteria, es mediante la acción directa del complemento. Es de gran importancia la neutralización de la leucotoxina de *M. haemolytica* mediante anticuerpos presentes en el suero o en las secreciones broncoalveolares. Esto se debe a que la leucotoxina destruye a los leucocitos de los rumiantes. La presencia de anticuerpos neutralizantes contra la LKT en el hospedador repercute en una mayor resistencia pulmonar a la infección ⁴⁴.

La infiltración de neutrófilos durante la neumonía de *M. haemolytica* esta asociada al daño de las células del epitelio alveolar y a la necrosis masiva del tejido. La importancia del daño mediado por neutrófilos en la patogénesis de la neumonía por *M. haemolytica* esta comprobada por el hecho de que la depleción de estos leucocitos disminuye el daño al tejido y la extravasación vascular de proteínas. El daño de los neutrófilos esta mediado por la liberación de enzimas como la elastasa, radicales oxidativos y citocinas y las cuales inician el daño a las membranas celulares. Las células afectadas responden sobre expresando necrosis y apoptosis. El daño ocasionado por estas células además de remover la mucosa pulmonar destruye la barrera innata, permitiendo la exposición de capilares y pequeños vasos que liberan más mediadores inflamatorios al pulmón y favorecen la proliferación bacteriana en el exudado ³⁰.

I.6 Patogenia de la Mannheimiosis Neumónica (Pasteurelosis Neumónica).

A pesar de numerosos estudios, hace falta aún conocer más acerca de la fisiopatología multifactorial de la pasteurelosis neumónica, también conocida como complejo neumónico en los ovinos y de los eventos que conducen al estado final de la enfermedad clínica ⁴⁵.

M. haemolytica esta presente en una pequeña proporción de la flora comensal oportunista de la nasofaringe de ganado sano. Bajo ciertas circunstancias, tanto del hospedador, como del medio ambiente, las bacterias colonizan el tracto respiratorio. El estrés del transporte, los partos y las infecciones concurrentes respiratorias de tipo viral, favorecen la colonización del tracto respiratorio y de esta manera contribuyen al desarrollo de la enfermedad ⁴⁶⁻⁴⁹. Cuando el hospedador se encuentra bajo situaciones

de estrés, *M. haemolytica* prolifera y es eliminada por las secreciones nasales en aerosoles ⁵⁰. La bacteria ingresa por aerosoles al animal sano, favoreciendo su movimiento a zonas más profundas, del árbol bronquial y proliferando rápidamente a nivel alveolar ⁵¹.

I.7 Factores predisponentes

El estado de estrés implica la instauración de una reacción neuroendócrina que conlleva a la liberación de esteroides de la corteza adrenal. Cuando el estímulo que provoca ésta reacción se prolonga, la liberación de esteroides endógenos principalmente cortisol, disminuirá la capacidad del animal para establecer una respuesta inmune adecuada. Si a éstas condiciones estresantes se les añade una higiene deficiente y una elevada humedad relativa (mayor al 80%), existe entonces una mayor posibilidad de que se presenten enfermedades respiratorias, debido al alto grado de contaminación y a la mayor supervivencia de los microorganismos en el medio ⁵².

El medio ambiente ejerce un poderoso efecto sobre las defensas del aparato respiratorio. Los elementos más importantes en este contexto son el frío y la humedad. Las temperaturas bajas causan éstasis ciliar, y esto a su vez produce la no eliminación del moco traqueobronquial que se acumula e inclusive llaga al alveolo, llevando consigo al agente infeccioso. El frío es importante también en la supervivencia de los microorganismos suspendidos en aerosoles, supervivencia que disminuye al aumentar la temperatura. Los aerosoles están constituidos, por una o varias bacterias o virus, recubiertas por una película de agua. Cuando la humedad relativa es muy elevada – superior al 90%- las gotas suspendidas se unen entre si por puentes de hidrógeno, formando partículas muy grandes que sedimentan con rapidez y no son inhaladas. De ser inhaladas, su gran tamaño las hace impactarse en las primeras porciones del árbol traqueobronquial, de donde son rápidamente eliminadas por el aparato mucociliar. Por otro lado las humedades relativas bajas menores al 50% tampoco favorecen la infección respiratoria porque las gotas no pueden permanecer suspendidas al haber poca humedad ambiental ⁵³.

El aparato respiratorio superior esta expuesto al aire del medio ambiente (frío, humedad, amoníaco y numerosos agentes infecciosos). Su principal función es calentar y humedecer el aire antes de que éste llegue al pulmón. Los estados fisiopatológicos del tracto respiratorio anterior (congestión y edema), pueden repercutir a nivel alveolar, reduciendo el intercambio gaseoso a éste nivel, así como el radio por el cual fluye el aire, ocasionando un incremento en la resistencia. La velocidad del aire se incrementa y se ven alterados los mecanismos que normalmente remueven patógenos aerógenos, así como también regulan la temperatura del aire y lo mantienen con cierta humedad ^{54, 55}.

I.8 Interacción virus-bacteria

Estudios experimentales con aerosoles han demostrado que las curvas de eliminación bacteriana están notablemente reducidas de 5 a 7 días después de una infección viral. Una vez deprimidos los mecanismos de defensa, las bacterias presentes en la flora nasal o en el medio ambiente fácilmente colonizan el pulmón. Las infecciones mixtas virales y bacterianas se presentan frecuentemente como resultado del llamado sinergismo virus-bacteria ²⁶.

M. haemolytica es en sí, la principal responsable del daño pulmonar, sin embargo, eventualmente pueden identificarse evidencias de participación viral en la lesión. Estas evidencias corresponden a la formación de cuerpos de inclusión que se presentan en el citoplasma de las células del epitelio bronquial y bronquiolar, así como en macrófagos, lo que resulta compatible con infecciones por Adenovirus. Además, en estos casos también se aprecia a nivel alveolar la coalescencia de células del epitelio o de macrófagos, a las que se les denomina sincicios, muy posiblemente asociados a virus respiratorio sincicial bovino o virus de la Parainfluenza. Los agentes virales como el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (herpesvirus 1), parainfluenza-3, diarrea viral bovina (DVB) y el virus respiratorio sincicial bovino, además de causar un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar, con lo cual se facilita la colonización pulmonar por *Mannheimia* ⁵⁶⁻⁵⁸.

Una vez que los agentes virales causan un cuadro clínico de leve a severo, dependiendo de las condiciones de estrés, en el tracto respiratorio superior hay una

multiplicación exagerada de *M. haemolytica* con la consecuente llegada de millones de estas bacterias al pulmón ocasionando un cuadro de neumonía aguda lobular fibrinonecrotizante caracterizada por depósitos de fibrina entre los lóbulos, exudado pleural en la cavidad pulmonar y áreas de necrosis a través de los lóbulos⁵⁶⁻⁵⁸.

I.9 Lesiones neumónicas ocasionadas por *M. haemolytica*.

La neumonía causada por *M. haemolytica* se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa severa. Sin embargo, se ha logrado aislar este agente de cuadros neumónicos que varían en cuanto a su severidad, distribución y morfopatología. Se pueden encontrar desde neumonías supurativas focales y difusas, hasta cuadros donde existen lesiones vasculares con trombosis y hemorragias, en los que adicionalmente los macrófagos se transforman y su núcleo se alarga, con aspecto de grano de avena y se agrupan formando ondas y remolinos. Es posible que los diversos cuadros sean ocasionados por cepas con propiedades patogénicas diferentes⁵⁹.

Las especies de *Mannheimia* pueden expresar una gran cantidad de potentes antígenos de superficie incluyendo lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PMH), fimbrias⁶⁰⁻⁶² y polisacáridos capsulares. Estas bacterias secretan una citolisina específica para leucocitos denominada leucotoxina (LKT), que mata fagocitos. La expresión de los diferentes antígenos ocurre en distintas condiciones de crecimiento. Esto aumenta la posibilidad de que la expresión de antígenos puede estar alterada *in vivo* y contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Cada uno de estos antígenos probablemente contribuye a la enfermedad clínica, en combinación con las secreciones y componentes celulares que favorecen la presentación característica de la enfermedad así como los cambios histopatológicos asociados al proceso. Dos mecanismos importantes en la inmunidad de los bovinos hacia *M. haemolytica* están mediados por el complemento y son la opsonización de la bacteria y la fagocitosis por neutrófilos⁴⁵.

La neumonía aguda intersticial y exudativa es considerada la más representativa del complejo respiratorio bovino; cabe mencionar que también se hace referencia a ella como pleurobronconeumonía fibrinopurulenta, en la clasificación anatomopatológica. Lo anterior se debe a que su respuesta inflamatoria exudativa es predominantemente

de tipo fibrinosa. Este exudado cubre la pleura de las regiones craneoventrales del pulmón; además, también existe una patente consolidación en estas zonas. La lesión es por lo general asimétrica y se presenta un daño más considerable en el pulmón derecho. Comúnmente se involucran los lóbulos craneales y cardiacos de ambos lados del pulmón, el lóbulo accesorio y la parte adyacente del diafragmático del pulmón derecho. Eventualmente, cuando la lesión ha evolucionado por algún tiempo, se aprecian adherencias de fibrina entre la pleura parietal y la visceral. Las secuelas más comunes son secuestros abscedados de las zonas más dañadas⁴⁵.

Microscópicamente, en la pasteurelosis neumónica se observa una severa pleuritis fibrinosa o fibrinopurulenta. Los vasos linfáticos de los septos interlobulillares muestran trombos de fibrina. Los bronquios y bronquiolos mayores muestran necrosis y descamación del epitelio y ocasionalmente, un exudado fibrinopurulento. Los septos alveolares aparecen engrosados y hemorrágicos; asimismo, se aprecia una infiltración severa de leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), tanto en septos como participando en la exudación a la luz alveolar y bronquial. En zonas de daño severo, la consolidación y la necrosis no permiten distinguir la arquitectura alveolar. Estas zonas de intenso daño se encuentran parcialmente demarcadas por células necróticas arremolinadas. En estas zonas pueden también apreciarse vasculitis y trombosis de algunas pequeñas venas. En otras áreas con menos daño se puede reconocer edema, fibrina, macrófagos activos y neutrófilos en la luz de los alveolos, además, pueden identificarse colonias bacteriana ⁴⁵.

I.10 Proteínas de Membrana Externa (PME) y su papel como inmunógenos.

Las proteínas de membrana externa (PME), son potenciales candidatos como inmunógenos, especialmente aquellas que se exponen en la superficie ^{63,64}. Los sobrenadantes de cultivos en fase de crecimiento logarítmico de *M. haemolytica* serotipo A1 han sido utilizados como vacuna, reportando que aumentan la resistencia a la pasteurelosis neumónica, específicamente contra este serotipo ^{65,66}.

Aunque el sobrenadante contiene una gran cantidad de leucotoxina, otros componentes aparte de ésta, representan inmunógenos importantes. El suero de animales inmunizados con sobrenadante, permite aglutinar células completas de *M. haemolytica*, lo cual indica que algunos componentes de la misma, liberados durante el

desarrollo de la bacteria, son probablemente antígenos de superficie celular solubles, más comúnmente de la membrana externa y la cápsula ⁶⁷.

Las PME de las bacterias Gram negativas tienen un importante papel en el proceso de infección. Algunas de ellas tienen función de porinas que permiten el transporte de sustancias a través de la membrana externa, mientras que la fosfolipasa A es esencial en ciertos patógenos para la invasión a las células del hospedador. Otras PME pueden actuar como receptores de alta afinidad para obtener hierro del hospedador ⁶⁸.

Se sabe además que las PME aisladas de *M. haemolytica* inducen alteraciones en la actividad biológica de los leucocitos polimorfonucleares. A dosis dependientes, se observó que reducen la capacidad de adherencia a la pared de nylon y actúan como quimiotactinas a concentraciones de entre 5 y 20 µg/ml. A bajas concentraciones (5 µg/ml) no se observaron resultados destacados. La preincubación con 5 µg/ml de PME, permitió la modificación de los valores en el índice de fagocitosis y la muerte intracelular, la cual se observó disminuida con respecto a los controles ⁶⁹.

Una bacteria en diferentes condiciones expresa diferentes fenotipos para adaptarse al nuevo medio. Cultivada en ausencia de hierro, la bacteria expresa en su superficie proteínas especialmente dedicadas a captarlo. Estas proteínas han recibido mucho interés por parte de diversos grupos de investigación; sin embargo, de momento no se conoce mucho de éstas y de sus mecanismos de patogenicidad, aunque inmunológicamente tienen significado importante en la inmunidad protectora contra la pasteurelosis neumónica causada por el serotipo A2. Se realizó la vacunación experimental en corderos SPF (libres de patógenos específicos) a partir de extractos con salicilato de sodio de cepas de *M. haemolytica* serotipo A2, cultivadas bajo condiciones de restricción de hierro, obteniéndose un 100% de protección; en contraste con la protección obtenida con organismos que crecieron bajo condiciones de suficiencia de hierro, en que fue sólo del 50% ⁷⁰.

La mayoría de las bacterias gram negativas tienen aproximadamente 20 PME, pero en algunas de éstas se encuentran presentes de 4 a 6 PME principales, que constituyen una gran parte del contenido proteínico de la membrana externa ⁷¹.

Se sabe que hay estimulación del sistema inmune por las PME, porque la bacteria se adhiere a las células del hospedador para evitar ser más fácilmente fagocitada, dañando de esta forma la función de la membrana celular ⁶⁸. Las PME de las bacterias gram negativas podrían ser elementos importantes para la elaboración de vacunas, ya que desarrollan y estimulan una respuesta inmune protectora y de resistencia a la pasteurelosis neumónica, al exponerse en la superficie de la bacteria, siendo así potenciales blancos para el sistema inmunológico del hospedador, desencadenando respuestas de fijación de complemento y de opsonización por anticuerpos ⁷².

En estudios donde el ganado bovino fue vacunado con proteínas reguladas por hierro (PRH) de 70, 77 y 100 kDa, los títulos de anticuerpos séricos no correlacionaron con la resistencia a la infección, pero los anticuerpos contra estas proteínas, en conjunción con los anticuerpos a otros antígenos de superficie, aumentaron la respuesta inmune. Existe incluso evidencia de que algunas de estas proteínas son conservadas entre los diferentes serotipos de *M. haemolytica* y tal vez éstas podrían proveer de alguna protección cruzada ^{73, 74}.

Existen estudios que indican que los anticuerpos contra las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* juegan un papel muy importante en la inmunidad contra la Pasteurelosis neumónica del ganado bovino, ya que son de los antígenos más importantes en la estimulación de la resistencia a dicha enfermedad. Otros estudios hechos por diferentes autores indican una correlación estadísticamente significativa entre la resistencia a la pasteurelosis neumónica y la presencia de anticuerpos séricos, dirigidos contra una gran cantidad de proteínas presentes en extractos salinos de toda la célula bacteriana ⁷⁵.

Morton y colaboradores en el 1995, demostraron que el ganado bovino fue resistente al desafío experimental con *M. haemolytica*, después de ser inmunizado con PME insolubles en sarcosil. En este estudio, los anticuerpos contra las PME con pesos moleculares de 16.5, 37, 45.5, 50.5 y 84.4 kDa mostraron una correlación significativa con la resistencia ⁷³.

En otro trabajo se evaluaron 8 proteínas de membrana externa de 94, 88, 68, 63, 53, 45, 35 y 27 kDa, obtenidas mediante sonicado a partir de aislamientos de *M.*

haemolytica biotipo A serotipo 2. Estas proteínas se seleccionaron con base en el reconocimiento por anticuerpos en inmunotransferencia demostrado por los sueros de los animales muestreados en condiciones de campo y desafiados experimentalmente. En la evaluación de la respuesta inmune hacia las PME, se tomaron en cuenta varios factores que podrían haber alterado el reconocimiento de las mismas por parte de los sueros de los diferentes grupos muestreados, tanto en condiciones de campo, como experimentales ⁷⁶.

La inmunidad contra *M. haemolytica* no está claramente entendida. Los anticuerpos séricos contra antígenos de superficie y contra la exotoxina, parecen ser importantes en aumentar la resistencia a la enfermedad experimental y la respuesta de anticuerpos a una gran cantidad de proteínas específicas de *M. haemolytica* se ha correlacionado con la resistencia a la enfermedad, obteniendo excelentes resultados. Vacunas vivas, muertas, así como extractos de la bacteria han sido estudiados bajo condiciones de experimentación y de campo, con diferentes resultados en cuanto a lograr aumentar la respuesta a la pasteurelisis neumónica ⁷⁷⁻⁷⁹.

Donachie comparó una cepa de *M. haemolytica* serotipo 2, recuperada de fluido pleural de un borrego con pasteurelisis neumónica, con la misma cepa cuando se le hizo crecer en medio de cultivo, encontrando diferencias en la expresión de las proteínas de 55, 70 y 100 kDa. Numerosos estudios han demostrado que las propiedades antigénicas de *M. haemolytica* pueden variar, tanto en *in vivo*, como *in vitro* ⁷⁰.

I.11 Microvesículas (MVs).

La secreción de los factores de virulencia de los patógenos Gram- negativos, es complicada por el hecho de que la envoltura bacteriana consiste en dos bicapas de lípidos, membrana interna y externa y periplasma entre ellas. Los patógenos Gram-negativos han desarrollado estrategias, algunas específicas de cada patógeno, capaces de permitir la activación de los diversos factores de virulencia los cuales ganan acceso al espacio extracelular, principalmente tejidos o corriente sanguínea del organismo hospedador ⁸⁰.

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. La secreción de proteínas en bacterias es un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en las últimas dos décadas⁸¹⁻⁸³. La mayor parte del trabajo se ha desarrollado en las bacterias Gram-negativas, en las que las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna (MI), y la membrana externa (ME) que es una bicapa asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos⁸³.

A pesar del número, la diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas (proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, reacciones de fosforilación, etc.), éstas son translocadas utilizando un número limitado de mecanismos. Las vías de secreción en las bacterias Gram-negativas han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y los autotransportadores. Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan⁸³. Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías **Sec-dependientes**, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las **Sec-independientes** en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal^{81, 82}. *M. haemolytica* utiliza principalmente los sistemas de secreción de tipo I y II, los cuales se describirán brevemente a continuación:

I.11.1 Sistema de Secreción Tipo I (SSTI).

Este mecanismo es utilizado por una amplia gama de bacterias para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas. Es una vía **Sec-independiente**, por lo que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplásmica; la secreción proteica se da en un solo paso desde el citosol hasta el

exterior celular ⁸¹. Los sustratos a exportarse por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal, que sin embargo, no es procesada. Esta señal es específica para ciertas subfamilias de sustratos como por ejemplo, las proteasas; sin embargo, aún se desconoce la naturaleza de dicha señal y el mecanismo mediante el que es reconocida ^{82, 83}.

El SSTI está constituido por tres componentes: un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (de sus siglas en inglés *ATP binding cassette*) en la membrana interna (MI) y una proteína periplásmica que también está anclada a la MI y que se denomina PF (proteína de fusión) ⁸²⁻⁸⁴ (Fig. 1A). Los sistemas de transporte ABC pertenecen a una superfamilia de transportadores que son también utilizados por bacterias Gram-positivas y que existen en eucariontes, desde la levadura hasta el humano, siendo los responsables del transporte de un gran número de iones y moléculas pequeñas ⁸⁵. Este tipo de secreción lo lleva a cabo la LKT de *M. haemolytica* para su liberación al medio.

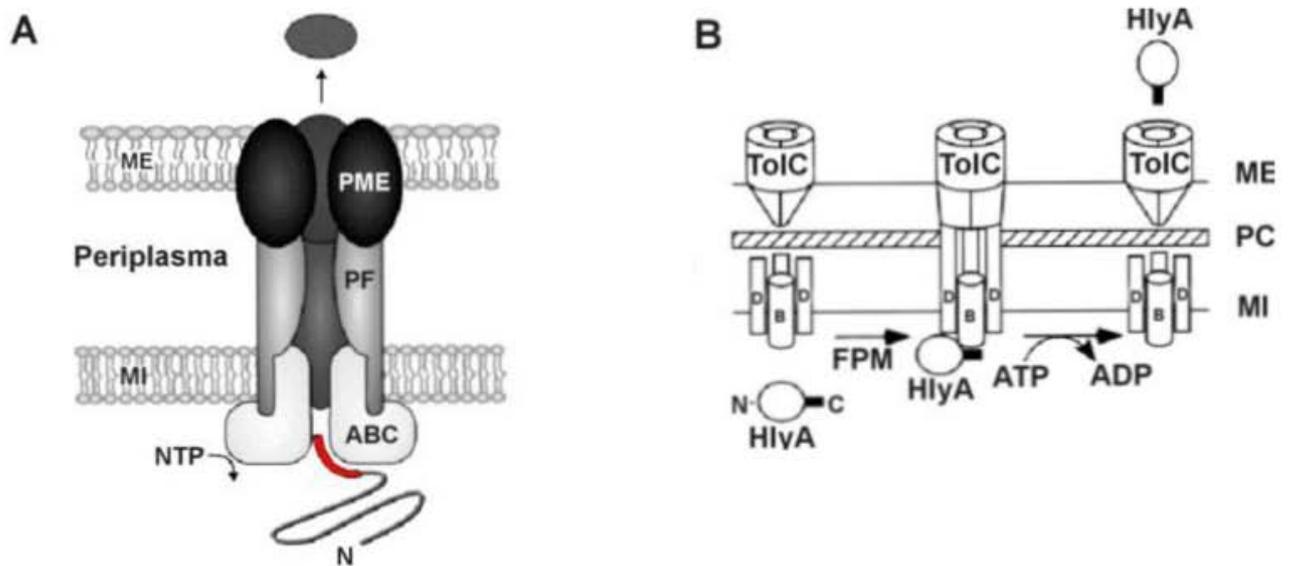


Figura 1. Componentes del SSTI. A) El sustrato se reconoce a través de una secuencia señal en el extremo carboxilo terminal (marcado en rojo). En este modelo de secreción, la proteína periplásmica de fusión PF interactúa con el transportador ABC en la MI y con la proteína PME que forma un canal en la ME⁸². B) Secreción de hemolisina HlyA en *E. coli*. HlyA interactúa con el transportador ABC HlyB (representado por la letra B) y la proteína de fusión trimérica HlyD (representada por la letra D), en un proceso dependiente de la fuerza protón motriz (FPM). La translocación de HlyA requiere de la interacción entre HlyD y el transportador trimérico TolC, así como de la hidrólisis de ATP⁸³.

I.11.2 Sistema de Secreción Tipo II (SSTII).

El SSTII es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas, como la toxina del cólera. Esta vía también se conoce como sistema general de secreción y ocurre en dos etapas. Primero, la maquinaria Sec transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática, por lo que el SSTII es una vía Sec-dependiente. Dicho péptido es generalmente una secuencia corta (de aproximadamente 30 aminoácidos), de los que uno o varios presentan carga positiva, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos. En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la ME por un complejo sistema multiproteico llamado tipo II o secretón⁸²⁻⁸³.

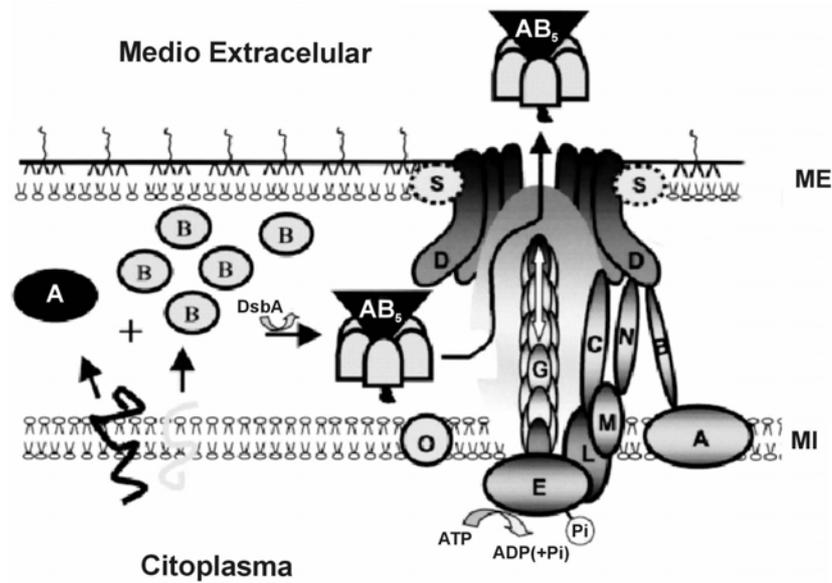


Figura 2. Modelo de secreción de la toxina del cólera por el SSTII. En la primera etapa, las subunidades A y B de la toxina se translocan a través de la MI como precursoros monoméricos utilizando la vía Sec. Posteriormente, en una segunda etapa, éstas se pliegan y ensamblan en el periplasma en un complejo AB₅. El complejo es dirigido al poro de la ME para su translocación. Las proteínas GspE, L y M regulan la secreción extracelular comunicando la información de fosforilación o hidrólisis de ATP entre la MI y el poro en la ME, posiblemente a través de la proteína GspC. Las proteínas GspG, H, I, J y K son procesadas por la proteína GspO y forman una estructura en forma de pilus cuyo componente mayoritario es la proteína GspG. Se postula que el pilus puede actuar empujando a la toxina a través del poro, por repetidas extensiones y retracciones como lo representa la flecha blanca ⁸⁶.

Tanto los Gram negativos patógenos como los no patógenos liberan vesículas ⁸⁷⁻⁹⁰ incluyendo *Escherichia coli* ^{91,92}, *Shigella spp.* ^{93,94}, *Neisseria spp.* ^{95,96}, *Bacteroides* (incluyendo *Porphyromonas*) *spp.* ^{97,99}, *Pseudomonas aeruginosa* ⁹⁹, *Helicobacter pylori* ¹⁰⁰, *Vibrio spp.* ^{101,102}, *Salmonella spp.* ^{103,104}, *Brucella mellitensis* ¹⁰⁵, *Campylobacter jejuni* ^{106,107}, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ¹⁰⁸, *Xenorhabdus nematophilus* ¹⁰⁹, *Borrelia burgdorferi* ¹¹⁰, *Actinobacillus seminis* ¹¹¹ y *Actinobacillus pleuropneumoniae* ¹¹². A este proceso se le ha determinado sistema de secreción tipo VI.

Muchas bacterias Gram (-) producen vesículas de membrana externa (MVs), durante su fase de crecimiento normal. Durante su formación, las MVs engloban una gran cantidad de componentes del periplasma; para *Pseudomonas aeruginosa* éstos incluyen fosfatasa alcalina, fosfolipasa C, proelastasa, proteasas y péptidoglicano-

elastasa ⁹⁹. Estos componentes, en su mayoría, son considerados importantes factores de virulencia, al igual que el LPS contenido en la membrana externa y el DNA arrastrado de la misma manera en las MVs. Las MVs podrían ser importantes factores de resistencia de las bacterias invasoras en las fases iniciales de la infección, concentrando sus factores de virulencia a través de dichas estructuras sobre el tejido del hospedador. El hecho de que las MVs transporten ciertas enzimas degradativas para la pared celular del huésped, permitirá que la bacteria desarrolle su propio microambiente para así colonizar e invadir ⁹⁹.

Estudios realizados en *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, demostraron que las MVs secretadas por esta bacteria contienen una gran cantidad de factores de virulencia. Sin embargo, la composición total de estas estructuras, así como de los mecanismos que permiten su formación y secreción, no están bien establecidos. La comparación mediante microscopía electrónica tanto de células bacterianas seccionadas como de MVs secretadas, demostró que estas últimas son estructuras esféricas compuestas de una bicapa de fosfolípidos de aproximadamente 50–100 nm de diámetro. El análisis por cromatografía ha permitido identificar los lípidos predominantes que componen la membrana externa de las MVs incluyendo al LPS, fosfatidiletanolamina y cardiolipina ¹¹³.

Estudios de microscopía electrónica en *Bordetella pertussis* permitieron observar que la bacteria libera MVs de membrana externa, que al ser analizadas por inmunoblot, revelaron contener integralmente la hemolisina adenilato-ciclase (AC-Hly), entre otros polipéptidos, así como LPS. Estos antígenos son potentes inmunógenos que desarrollan una inmunidad protectora en el huésped, por lo cual las MVs de *B. pertussis*, son consideradas excelentes candidatas para desarrollar vacunas acelulares contra la bacteria ¹¹⁴.

Dadas las características de las MVs, en muchos géneros bacterianos se ha propuesto su utilización como biológicos, obteniéndose exitosas repuestas a nivel del sistema inmune. Tal es el caso de *Neisseria meningitidis* en donde se desarrolló una vacuna de MVs, la cual fue probada en ratones y cuyes, desarrollándose una actividad bactericida importante en los sueros de estos animales ¹¹⁵.

I.12. Vacunación.

Las vacunas comerciales contra la pasteurelosis en borregos, han estado disponibles desde principios de los 70's, pero su eficacia sigue siendo cuestionable. Estas vacunas son generalmente bacterinas, elaboradas con células muertas completas de varios serotipos. La pasteurelosis en el ganado bovino, se asocia casi exclusivamente a *M. haemolytica* A1, pero los múltiples serotipos asociados con la enfermedad en borregos, hace que la producción de éstas vacunas se dificulte. Las vacunas han sido inconsistentes en su habilidad para reducir la incidencia y severidad de la enfermedad. Las bacterinas convencionales son producidas principalmente con extractos salinos de células completas inactivadas, extractos de leucotoxina y extractos de organismos en crecimiento con medios restringidos de hierro¹¹⁶. Existen vacunas de *M. haemolytica*, con 7 serotipos A y 3 serotipos T, las cuales han estado comercialmente disponibles por muchos años, pero se ha reportado que estas son de valor limitado en situaciones en campo¹¹⁷.

En la actualidad se ha desarrollado una diversidad de inmunógenos para prevenir la neumonía por *M. haemolytica*, con resultados aparentemente satisfactorios en algunos casos.

Los inmunógenos a base de bacterias vivas de cultivos de 6 horas aplicados vía intramuscular, son los que han dado resultados más satisfactorios. Se argumenta que este tipo de biológicos son eficaces porque los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico, material capsular, leucotoxina y otros antígenos no muy bien definidos. También la replicación limitada del agente en el sitio de la inoculación favorece la estimulación de los mecanismos inmunológicos mediados por células¹¹⁸.

La eficacia de la vacunación requiere que la respuesta inmune esté encaminada a los factores o antígenos que estén relacionados con la protección. Además es de utilidad examinar el estado inmune de los animales a nivel campo. La prevención de Pasteurelosis Neumónica por inmunización se ha intentado durante décadas. En relación al uso de las bacterinas, se ha discutido de manera amplia acerca de la protección que brindan, debido a que en la mayoría de las veces se concluye que confieren escasa protección e incluso se menciona que pueden incrementar el daño pulmonar¹¹⁹⁻¹²¹.

La ineficacia de estos biológicos se debe a que al ser inoculados a un animal, se producen anticuerpos séricos contra antígenos capsulares, sin embargo, existen otros antígenos que participan en la patogénesis de la enfermedad y que no están contenidos en estas bacterinas, como la leucotoxina de *M. haemolytica*¹²². A pesar de lo anterior, en México se siguen utilizando las bacterinas, sin saber a ciencia cierta su eficacia, serotipos utilizados y las características de las cepas contenidas.

En México se han introducido biológicos para la prevención de la Pasteurelisis Neumónica de los bovinos y que se han empezado a utilizar en borregos e incluso en cabras, algunos de estos biológicos tienen incluida a la leucotoxina de *M. haemolytica* como parte de los antígenos que inducen protección. Si bien, la leucotoxina es el antígeno mejor caracterizado, el que ha demostrado inducir mejor protección y es un antígeno común a todos los serotipos de *M. haemolytica*, no hay que olvidar que los antígenos capsulares, entre otros, también son importantes y éstos si son específicos del serotipo de la bacteria. En bovinos el serotipo más común y el que está contenido en estos biológicos es el serotipo A1. Sin embargo, en ovinos el serotipo más común reportado a nivel mundial es el A2. Bajo el supuesto de que las bacterinas para prevenir la Pasteurelisis Neumónica no son muy eficaces y considerando que los laboratorios de producción de biológicos nacionales solo producen bacterinas, se han introducido recientemente en el mercado nacional, vacunas de nueva generación. Estos biológicos son bacterinas más "leucotoxoides", o productos de la superficie bacteriana más "leucotoxoides". También estos biológicos fueron desarrollados inicialmente para bovinos y se quieren utilizar en forma extensiva en ovinos y caprinos sin evaluación previa¹²³.

Actualmente existe en nuestro país, una línea de investigación relacionada con la evaluación de éstos biológicos. El objetivo general de este proyecto, es evaluar de manera comparativa varios inmunógenos comerciales, en condiciones controladas y en campo. Se ha incluido como grupo control un inmunógeno experimental a base de bacterias muertas y sobrenadante rico en leucotoxina y otros antígenos de *Mannheimia haemolytica* para prevenir la Mannheimiosis Neumónica (Pasteurelisis Neumónica). Se ha utilizado como modelo al ovino, por la facilidad económica de trabajar en esta especie^{123, 124}.

Estas investigaciones han dado resultados alentadores hasta el momento, tanto a nivel laboratorio (experimental), como en ensayos de campo, donde se ha demostrado la eficacia de estos inmunógenos. Dentro de estos resultados destacan: la capacidad de la mayoría de estos biológicos para inducir una respuesta de anticuerpos contra los principales antígenos relacionados con la patogenicidad de la bacteria, antígenos capsulares, leucotoxina, proteínas de membrana externa, etc.). En los estudios comparativos con biológicos comerciales, se demostró que el inmunógeno experimental, posee características de respuesta similares a los comerciales, e incluso en algunas las supera. Es conveniente resaltar, que se incluyeron variables como dosis y producción de anticuerpos contra antígenos capsulares (serotipo 1 y 2), contra la leucotoxina y contra las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*^{124, 125}.

II. JUSTIFICACIÓN

La protección conferida por las vacunas contra los diferentes serotipos de *Mannheimia haemolytica* y en particular, aquéllos que afectan a pequeños rumiantes, no ha resultado exitosa. La relevancia de obtener un inmunógeno eficaz, radica en la posibilidad de prevención y control de la Pasteurelisis neumónica ovina en el país.

III. HIPÓTESIS

Si las múltiples proteínas de interés inmunogénico, están contenidas en pequeñas microvesículas (MVs) de membrana externa, eliminadas por *Mannheimia haemolytica*, una vez que se le somete a estrés, entonces la capacidad inmunogénica de estas MVs sería capaz de despertar una adecuada respuesta inmune humoral, que evite que los individuos que se expongan a las cepas de campo, desarrollen cuadros patológicos característicos de la enfermedad por presentar una respuesta inmune adecuada.

IV. OBJETIVO GENERAL:

Obtener y caracterizar a las Microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 (cepa de campo) y evaluar la respuesta inmune desarrollada por ovinos inoculados con ellas, para proponer su utilización como biológico.

V. OBJETIVOS PARTICULARES:

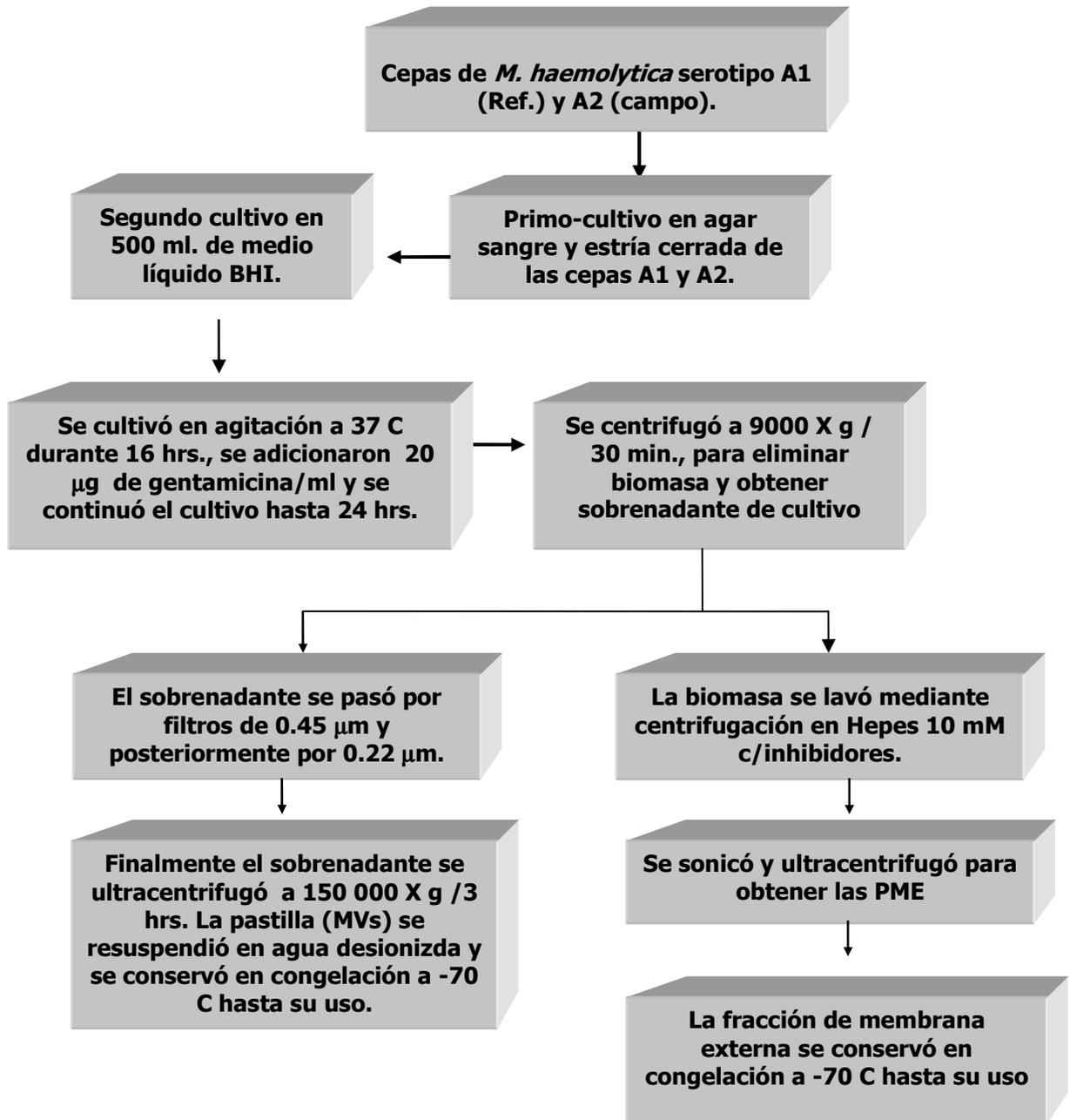
- Obtener MVs a partir del crecimiento bacteriano en medio líquido (BHI adicionado con CaCl₂), en un cultivo estresado con gentamicina.
- Purificar MVs mediante ultrafiltración y ultracentrifugación.
- Caracterizar los principales antígenos (LKT, LPS, PME y DNA) en las MVs de *Mannheimia haemolytica*.
- Determinar la respuesta inmune humoral, de ovinos inmunizados con MVs, evaluando IgG e IgM mediante ELISA indirecta.
- Desafiar a los ovinos inmunizados, con el virus de PI3 y posteriormente con una cepa virulenta de campo de *M. haemolytica* A2, inoculadas ambas por vía endotraqueal.

- Evaluar mediante histopatología los órganos y tejidos involucrados en el proceso patológico de la Pasteurelisis neumónica.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

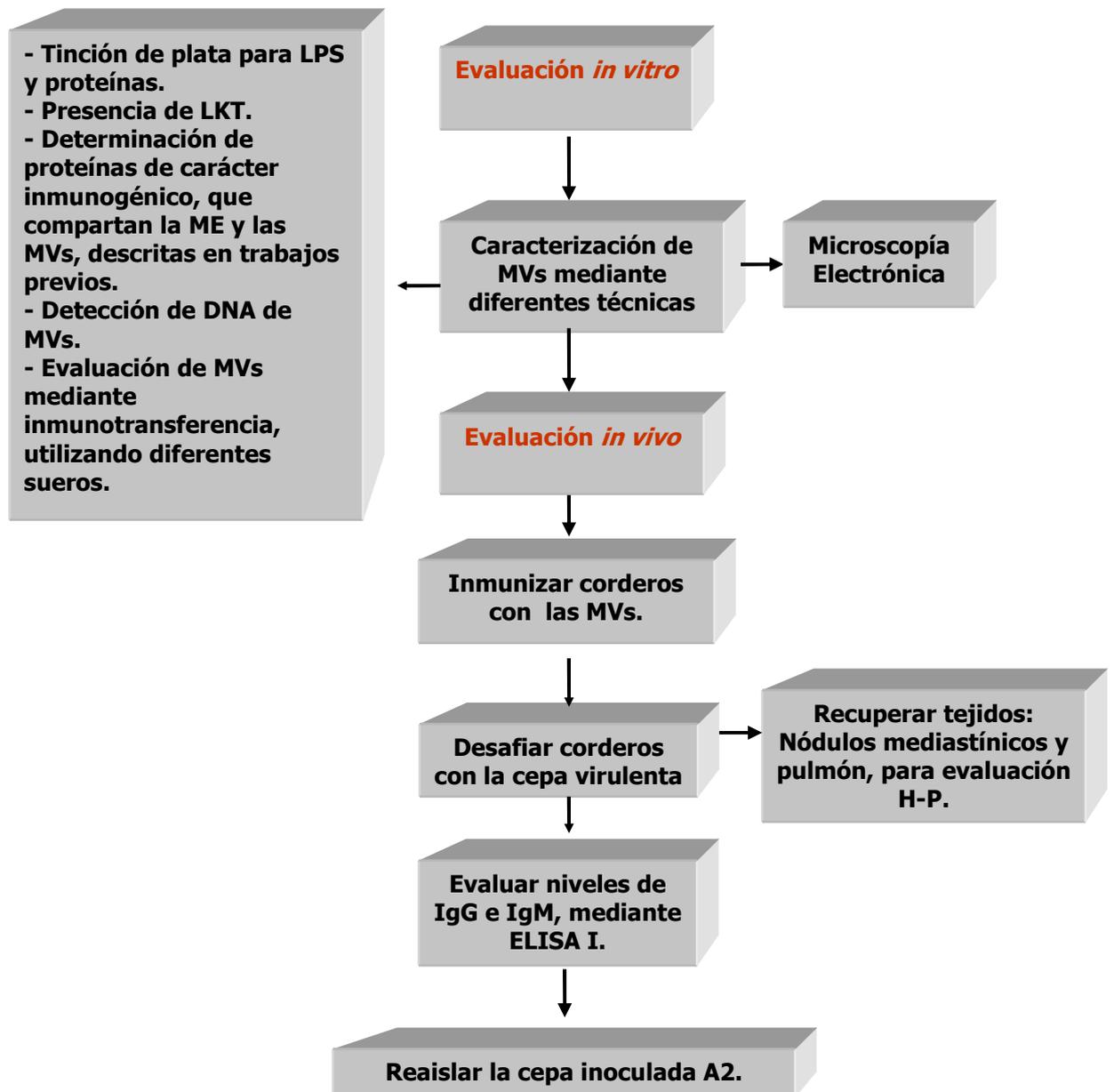
Se utilizaron cepas de *M. haemolytica* serotipo A1 (National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa 50010) y otra del serotipo A2 (cepa de campo), la cual fue obtenida de un trabajo previo, a partir de lesiones neumónicas de un animal muerto, muestreado en campo. El procedimiento con dichas cepas, para la obtención de MVs y PME, se muestra el **Esquema 1**.

ESQUEMA 1. Procedimiento para la obtención de MVs y PME de *M. haemolytica* A1 y A2.



El trabajo experimental se dividió en dos fases de evaluación: *in vitro* e *in vivo*, en el primer caso, la metodología a desarrollar se enfocó a caracterizar a las MVs de *M. haemolytica* mediante diferentes técnicas y en la fase de evaluación *in vivo* se inmunizó un grupo de corderos con las MVs, administrándolas por diferentes vías para su posterior evaluación, según lo muestra el **Esquema 2**.

ESQUEMA 2. Metodología de la evaluación *in vitro* e *in vivo* del trabajo experimental.



VI.1 FASE DE EVALUACIÓN *IN VITRO*.

VI.1.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Se utilizó una cepa de campo virulenta de *M. haemolytica* serotipo A2, obtenida de trabajos anteriores ⁷⁶, así como también se utilizó como control una cepa serotipo A1 (National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa 50010), dada la gran cantidad de investigaciones realizadas en este serotipo. Se realizó el cultivo de las bacterias en placas de agar sangre, por el método de estría cerrada, incubándose 24 horas a 37 C y posteriormente se realizó la tinción de Gram, así como las pruebas bioquímicas pertinentes para su identificación. Los serotipos capsulares de *M. haemolytica* fueron determinados mediante hemoaglutinación indirecta, utilizando antisueros de referencia y siguiendo la técnica sugerida por Frank y col. en microplacas de titulación de 96 pozos ¹⁴.

VI.2 Obtención de microvesículas (MVs).

Se creció cada cepa bacteriana en 100 ml de medio líquido BHI a 37 C por 12 hrs. Se tomaron 50 ml del cultivo y se agregaron a 500 ml de BHI adicionando con 2 ml de CaCl₂ 1M. Se incubó por 12 ó 16 hrs, que corresponde al tiempo en el que el cultivo se encuentra en fase de crecimiento logarítmico. En este momento se agregaron 10 µl de gentamicina por ml de cultivo y se completó la incubación hasta 48 hrs. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 9000 X g por 15 min. para eliminar la biomasa y recuperar el sobrenadante de cultivo, el cual se hizo pasar por filtros Millipore de 0.45 y 0.22 µm de poro. El sobrenadante se ultracentrifugó a 150, 000 x g / 3 hrs. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó la pastilla en un total de 2 ml de agua desionizada. La pastilla se congeló a -70 C hasta su uso ⁹⁹.

VI.3 Cinética de obtención de MVs.

Dadas las características de crecimiento de *M. haemolytica*, así como de la producción de microvesículas, se estableció una cinética de obtención de microvesículas de 16, 24 y 48 hrs., ya que se observó que al análisis electroforético, las bandas que correspondían a MVs desaparecían a las 48 hrs. de incubación, suponiendo que a este tiempo las células bacterianas dejaban de producir cantidades adecuadas de microvesículas o bien morían. Por lo que se procedió a establecer los diferentes tiempos de cultivo y concentración de antibiótico que diera un mejor rendimiento de dichas estructuras. Con la cinética se estableció que el mejor tiempo de incubación correspondía a las 24 hrs. adicionando al cultivo con 20 µg de gentamicina /ml. Se comprobó dicho rendimiento al observar los cultivos en el microscopio electrónico así como en corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 12%.

VI.4 Obtención y cuantificación de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*.

Las células recuperadas durante el proceso de obtención de MVs, se lavaron por centrifugación a 4 C, a 3500 X g / 25 min. con HEPES 10 mM (2 veces) y resuspensión y finalmente se centrifugaron a 4 C, 3500 X g por 20 min. La pastilla se resuspendió en 60 ml de HEPES 10 mM conteniendo 1 mg de DNAsa y 1 mg de RNAsa pancreática, adicionando los inhibidores de proteasas PMSF 0.1 mM en 2-propanol y EDTA de 1 a 3 mM.

Para obtener las fracciones celulares se sonicó la muestra distribuyéndola en varios tubos en cantidades de 10 a 15 ml sobre un baño de hielo. A cada muestra se le realizaron 10 pulsos de 10 seg. X 1 min. de descanso, de tres tiempos cada uno con sonicador de punta (80 watts). Se centrifugó la muestra sonicada a 1000 X g / 15 min para la remoción de los restos celulares o células completas. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 100,000 X g / 2 hrs en HEPES. La pastilla obtenida se consideró que correspondía a una fracción de la envoltura celular cruda que contiene membrana externa y membranas citoplasmáticas. La pastilla de membranas totales se disolvió en amortiguador con sarcosil al 1% (10 ml) y se puso en agitación suave por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente la muestra se centrifugó a 100,000 X g / 1 hr. y el paquete resultante (membrana externa), se

disolvió en agua desionizada, mientras que el sobrenadante correspondió a la fracción de membranas internas ⁶⁸.

VI.5 Purificación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos.

De las fracciones celulares obtenidas, la fracción que correspondió a proteínas de membrana externa así como la pastilla de MVs se sometieron a tratamiento para purificar las proteínas, en este caso a partir de una muestra que estuvo en contacto con detergentes (sarcosil) y que contiene una mayor cantidad de lípidos.

En 400 μ l de metanol se adicionaron 100 μ l de la solución de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*, se agitaron en vortex y posteriormente se centrifugaron durante 10 s a 9,500 X g en microtubos cónicos de polietileno, para la colección total de la muestra, que correspondió a la fracción de membrana externa. Se adicionaron 100 μ l de cloroformo a la muestra anterior, sometiéndola nuevamente a la acción de vortex y se centrifugó 10 s a 9000 X g. Para muestras con alto contenido de fosfolípidos, como la que se obtuvo a partir de *M. haemolytica*, se emplearon 200 μ l de cloroformo. La separación de las fases se llevó a cabo adicionando 300 μ l de agua destilada y se sometió suavemente a la acción del vortex, centrifugando finalmente 1 min a 9000 X g. La fase superior se removió cuidadosamente y se desechó. Por último se adicionaron 300 μ l de metanol (CH_3OH) al resto de la fase clorofórmica inferior y la interfase con la proteínas precipitadas, para mezclarlas y centrifugarlas 2 min a 9000 X g; el sobrenadante se removió. La pastilla de proteínas se secó bajo rocío de aire y se guardó hasta su uso ¹²⁶.

VI.6 Cuantificación de proteínas.

El contenido de proteínas totales se determinó por colorimetría, utilizando el método de microtitulación de Bradford y un estándar de albúmina sérica bovina. Se obtuvo una curva con albúmina sérica bovina de 1 a 10 μg / ml, PBS y reactivo de Bradford, en placas de fondo plano. Se colocaron 10 μl de muestra de proteína de *M. haemolytica* más 190 μl de reactivo de Bradford, determinando la cantidad de proteína mediante la lectura de las placas en el lector de ELISA a 450 nm y por regresión lineal ¹²⁷.

VI.7 Preparación de la muestra para el corrimiento electroforético.

La separación analítica de las proteínas de la fracción de membrana externa y de las MVs, se hizo en función de sus pesos moleculares, utilizando PAGE-SDS por el método de Laemmli ¹²⁸. Se ajustó la concentración de proteínas necesaria a utilizar en el corrimiento electroforético, tanto de la fracción de membrana externa como de las MVs, a 25 μg de proteína por cada 10 μl . La pastilla de proteínas limpias se disolvió en 50 μl de amortiguador de lisis y se colocaron 10 μl de la muestra en cada carril del gel de poliacrilamida.

VI.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Los antígenos se solubilizaron mezclando 50 μg del antígeno en 20 μl del amortiguador de muestra, sometiéndose a ebullición (95 C) durante 10 min. Para determinar cuales proteínas comparten la membrana externa con las MVs, se separaron y compararon por sus pesos moleculares mediante SDS-PAGE de acuerdo al método de Laemmli ¹²⁸. Para ello se colocaron 10 μl de la muestra en cada carril y se corrieron en geles al 12% a un voltaje de 80 volts para el gel concentrador y 100 volts para el gel separador en solución amortiguadora de corrida. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie durante 1 hr. a temperatura ambiente y en agitación suave, posteriormente se destiñeron sometiéndolos a una solución de lavado, hasta visualizar claramente las bandas deseadas y finalmente éstos se conservaron en ácido acético al 10% ¹²⁹. En otros casos los geles se sometieron a tinción de plata para proteínas, lipopolisacárido (LPS) o se transfirieron fracciones de membrana externa a membranas

de nitrocelulosa para Western blot. El peso molecular de las bandas tanto de la fracción de membrana externa como de las MVs fue estimado según su posición en el gel (rfc), comparándolo con un estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos, presentes en el mismo gel y mediante un programa de cómputo (GeneTools from SynGene, England; Cambridge).

VI.9 Tinción de plata para proteínas.

Se fijó el gel en una solución de metanol - ac. acético - agua (5:1:4) toda la noche. Posteriormente se retiró la solución fijadora y se lavó el gel por 15 min. en 500 ml de agua destilada por 3 veces. La mezcla de tinción se preparó al momento, la cual contenía 56 ml de Hidróxido de sodio (NaOH 0.1 M), 5 ml de hidróxido de amonio (NH₄OH al 100%) y 2 g de nitrato de plata (AgNO₃) disueltos en 10 ml de agua desionizada muy fría (- 4 C) adicionada gota a gota y finalmente 200 ml de agua desionizada, adicionando primero 100 ml y después los otros 100. Se dejó el gel en agitación vigorosa por 10 min. Se realizaron 4 lavados de 1 min. cada uno con agua destilada. Se reveló con 50 mg de ácido cítrico disueltos en 200 ml de agua destilada más 1 ml de formaldehído (38%) y se aforó a 1000 ml. Se pasaron de 250 a 500 ml al cristalizador y se mantuvo la agitación hasta la aparición de bandas proteínicas (de 10 a 15 min. aproximadamente). Se tiró la solución y se detuvo la reacción con 10 ml de isopropanol al 25%, ácido acético al 7% más 200 ml de agua desionizada, agitando por 1 hr. y cambiando a agua destilada para almacenar a 4 C, o bien se deshidrató el gel¹³⁰.

VI.10 Tinción de plata para LPS.

Se fijó el gel en una solución fresca que contenía isopropanol al 25% y ac. acético al 7%, durante toda la noche. Se decantó la solución y se oxidó el gel por 5 min. en una solución que contenía 150 ml de agua desionizada , 1.05 g de ac. peryódico y 4 ml de la solución fijadora. Se lavó 8 veces por 15 a 20 min., cada una en 200 ml de agua destilada. Posteriormente se tiñó por 10 min. con una solución fresca que contenía 28 ml de hidróxido de sodio (NaOH al 0.1N), 1.25 ml de hidróxido de amonio (NH₄OH al 29.4%) y 5 ml de nitrato de plata (AgNO₃ al 20%). Después de teñir, se lavó el gel 4 veces en 200 ml de agua destilada por 10 min. cada lavado. Posteriormente se preparó una solución que contenía 50 mg de ácido cítrico 0.5 ml de

formaldehído al 37%. Dicha solución se agregó al gel, el cual requirió de 5 a 10 min hasta obtener la intensidad deseada en las bandas. Para conservar el gel se sumergió por 60 min. en 200 ml. de una solución que contenía 10 ml de ácido acético al 7% ¹³¹.

VI.11 Microscopía Electrónica de transmisión.

Tinción Negativa

Las rejillas de níquel se recubrieron con formvar y se sombrearon con carbón. Se colocaron de 10 a 15 μ l de la muestra sobre la rejilla por su cara más oscura en donde se colocó la película y se dejó reposar por 15 min. Posteriormente se retiró el exceso de colorante de la muestra con un papel filtro, secando cuidadosamente la rejilla y adicionando finalmente de 10 a 15 μ l de ácido fosfotúngstico al 1% pH 6.0 por 1.5 min. ⁹⁹.

VI.12 Eliminación de plásmidos bacterianos.

Se realizó un cultivo de *M. haemolytica* en 25 ml de medio líquido BHI, posteriormente se tomaron muestras alícuotas de 5 ml y se crecieron nuevamente en 50 ml de medio líquido BHI en matraces nefelométricos. Se trabajó por duplicado con los matraces, el primero se utilizó como control y al segundo se le adicionó naranja de acridina (NA), la cual sirve como mutágeno, para curar de plásmidos a las bacterias. Esta se adicionó directamente sobre el cultivo en fase log. temprana (2-3 hr. de cultivo). Una vez alcanzada la fase log. temprana, se tomaron alícuotas de 100 μ l cada una, con intervalos de 30 min. tanto de los matraces adicionados con diferentes concentraciones de NA (10, 20, 40 y 60 μ g por ml de cultivo), como de los matraces control, para posteriormente realizar el sembrado en cajas de agar BHI con espátula de vidrio. Los cultivos bacterianos se sembraron a 37 C durante toda la noche y posteriormente se recuperaron las colonias que crecieron en presencia de NA así como las cepas control. Las colonias que crecieron en presencia de NA se resuspendieron en 5 ml de BHI líquido para ser cosechadas. De dicha cosecha, se retomaron los 5 ml de cultivo y se adicionaron 5 ml de SSF en tubo de ensaye, quedando una suspensión al 100% de bacterias que crecieron en presencia de NA. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones logarítmicas hasta de 1×10^{-5} de la cual se tomaron muestras alícuotas de 100 μ l cada una y se sembraron en placa BHI agar. El cultivo se incubó a

37 C toda la noche y posteriormente se procedió a seleccionar las colonias que se resembraron en agar con y sin ampicilina mediante parcheo. El antibiótico se seleccionó previo antibiograma en sensidiscos de bajo, mediano y amplio espectro, determinándose así la resistencia a ampicilina. Las colonias que crecieron sobre agar con ampicilina fueron aquellas que no perdieron su plásmido y las que no crecieron perdieron el plásmido de resistencia. A partir de las colonias que crecieron en BHI sin ampicilina se extrajeron las MVs ¹³².

VI.13 Extracción de DNA plasmídico.

Se obtuvo una pastilla de MVs a partir de un cultivo en medio líquido y se lavaron en Hepes 10 mM pH 7.4 mediante centrifugación a 13 000 X g durante 15 min. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 200 µl de la Sol. I (50 mM de glucosa, 25 mM de TRIS-HCL (pH 8) y 10 mM de EDTA (pH 8), que se encontraba a 4 C. Se agitó suavemente y se agregaron 400 µl de la Sol. II (0.2N de NaOH y SDS al 1%), recién preparada y se agitó por inversión. Se procedió a guardar el tubo por 5 min. en hielo. Posteriormente se agregaron 300 µl de la Sol. III (60 ml de 5M de acetato de potasio, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de H₂O desionizada estéril) que debe estar a 4 C. Se agitó hasta formar un coágulo y se mantuvo a -20 C por 30 min, posteriormente se centrifugó a 13 000 X g por 10 min. Se lavó con un volumen igual al que se obtiene del sobrenadante de cloroformo más fenol y alcohol isoamílico a una relación de 25:24:1. En el sobrenadante se encontró el DNA plasmídico y el RNA bacteriano, durante este proceso se formaron dos fases, la fase superior se recuperó y se le agregaron dos volúmenes iguales al volumen que se retiró (aprox. 1200 µl) de etanol absoluto la cual se guardó a -70 C por 2 hrs. Finalmente se centrifugó a 13000 X g por 15 min, hasta obtener una pastilla, la cual se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril y se corrió la muestra en gel de agarosa al 1% ^{133, 134}.

VI.14 Western Blot (Inmunotransferencia).

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, las bandas proteínicas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia a 80 volts ó 400 mA durante una hora ¹³⁵.

La membrana de nitrocelulosa fue tratada por 24 hrs con leche descremada al 5% con la finalidad de bloquear puntos de unión no específicos para los anticuerpos. Posteriormente, se lavó la membrana por tres ocasiones con PBS-Tween 20 al 0.05% por 15 min. cada una y se procedió a incubar el anticuerpo primario (sueros de corderos clínicamente sanos, clínicamente enfermos, anti-Apx1 y un suero anti-adhesina de una proteínas de 60 kDa de *A.p.* 1) a probar, por 2 hrs. a 37 C o toda la noche a 4 C. Se lavó la membrana nuevamente por tres ocasiones en PBS- Tween 20 y se incubó el segundo anticuerpo peroxidado (Proteína A) por 2 hrs. a 37 C o bien a 4 C toda la noche. Finalmente, se reveló la membrana con 3´3 diaminobencidina (DAB) al 0.05% y 1.2 ml de solución NI-Co (20 mg de cloruro de níquel más 20 mg de cloruro de cobalto) y 1 ml de H₂O₂ al 0.1%. Una vez preparadas, estas soluciones se agregaron a la membrana en agitación suave y la reacción se paró con agua corriente, hasta obtener la intensidad de bandas deseadas ¹³⁵.

VI. 15 FASE DE EVALUACIÓN *IN VIVO* (DESAFÍO EXPERIMENTAL).

VI.15.1 Preparación del inóculo de MVs de *M. haemolytica* A2.

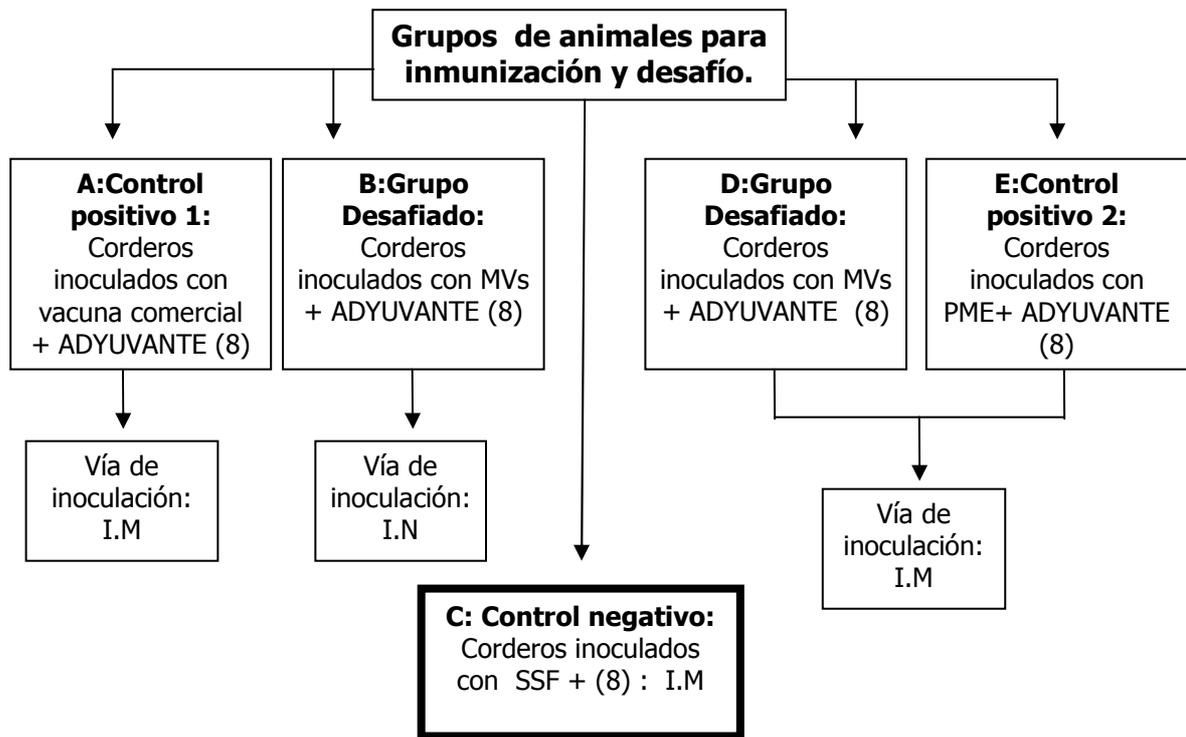
Una vez determinados los antígenos en las MVs de *M. haemolytica* A2, se procedió a preparar los inóculos que se utilizaron durante la evaluación *in vivo*. A la cepa de *M. haemolytica* A2, se le dio un pase en animales vivos y fue tratada con Naranja de Acridina, de esta cepa se obtuvieron MVs utilizando la metodología descrita anteriormente y se estandarizaron los inóculos a 25 µg de proteína/17 Kg de peso vivo, determinando la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford ¹²⁷. La concentración del inóculo se estableció obteniendo la proporción en Kg de los corderos a evaluar y el peso promedio de un humano adulto (70Kg) según los datos reportados en la vacunación con MVs de diferentes géneros bacterianos ¹⁴³.

VI.16 Fase de inmunización

Se trabajó con un grupo de 40 corderos de aproximadamente 2 a 3 meses de edad, con un peso promedio de 17 Kg. A partir de la fecha de llegada de los animales a las instalaciones del CENID- Microbiología, se comenzaron a realizar muestreos de sangre cada tercer día (**Cuadro 1.**), dándoles dos semanas de aclimatación, para posteriormente comenzar con la inmunización del rebaño. Seguido de esto, se procedió

a dividir a los 40 corderos en cinco grupos de 8 animales cada uno, según lo muestra el **Esquema 3**. A cada grupo se le inmunizó con MVs de *M. haemolytica* A2 por diferentes vías (**Esquema 3**), excepto para el grupo A, en donde se utilizó una vacuna comercial que contenía toxoide de *M. haemolytica* A1 inactivado con antígenos de superficie del mismo serotipo y de *P. multocida*, serotipo A y D libre de células con adyuvante munokynin, la cual se administró por vía intramuscular (I.M) y al grupo E, al cual se le administraron proteínas de membrana externa (PME) con adyuvante (anfollinas) por vía intramuscular. Al resto de los grupos que requirieron de adyuvante, se les administraron "ANFOLLINAS" para dicha función. Por otro lado, se eligió evaluar la vía intranasal (I.N), dado los reportes que existen en *Neisseria meningitidis*, en donde las inmunizaciones con Mvs por esta vía en humanos han resultado en persistente respuesta de anticuerpos a nivel de la mucosa (IgA) así como en excelentes títulos de anticuerpos séricos (IgG) con actividad bactericida en la meningitis meningococal.

ESQUEMA 3. Distribución de los diferentes grupos a evaluar durante la inmunización y desafío.



I.N: Intranasal

I.M: Intramuscular

MVs: Microvesículas

PME: Proteínas de membrana externa

SSF: Solución salina fisiológica

VI.17 FASE DE DESAFÍO.

Se siguió un protocolo de desafío con infección viral con el virus de Parainfluenza tipo 3 (PI3) por vía endotraqueal y una cepa de campo de *M. haemolytica* A2, aplicada 8 días después del virus por vía endotraqueal, según lo muestran el **Cuadro 1** y el **Cuadro 2**. En todos los casos, a los animales se les sometió a inmunosupresión, mediante la administración de 2 ml de dexametasona por vía intramuscular (3 mg /ml) ⁷⁶.

VI.17.1 Desafío viral.

Todos los corderos se desafiaron el día 37 del experimento (**Cuadro 2**) con virus vivo de PI3 que tenía un título de 1×10^6 , el cual se replicó en células MDBK (Células de riñón de bovino) al 50% en medio MEM de Glassgo. Se utilizaron 2 ml de la solución que contenía el virus, la cual se inoculó por vía endotraqueal, desinfectando con alcohol previamente la zona a puncionar, la cual se localizó entre los anillos traqueales del 2º tercio de la misma. Los animales del grupo control fueron desafiados de la misma manera. Posteriormente a todos los grupos, se les administraron 2 ml (3 mg/ml) de dexametasona por vía intramuscular de forma continua hasta el día del desafío bacteriano ⁷⁶.

VI.17.2 Desafío bacteriano.

VI.17.2.1 Estandarización del inóculo bacteriano.

Para completar el desafío, se realizó 8 días después del desafío viral una segunda inoculación de los animales con una cepa patógena de *M. haemolytica* serotipo A2, recuperada de un animal muerto de un proceso neumónico en campo, la cual se reactivó al darle un pase en dos corderos vivos, siguiendo todo un protocolo de inmunización, a menor escala como el que se estableció en el desarrollo de este trabajo, comprobando así su patogenicidad.

La cepa de *M. haemolytica* A2 se cultivó en placas de agar sangre por 18 hrs. a 37 C. Después de este tiempo de incubación, se tomaron las colonias con un asa bacteriológica en condiciones estériles, para resuspenderlas en 2 ml de solución salina

fisiológica mediante agitación suave. La suspensión se ajustó por comparación de turbidez al tubo 0.5 de Mc Farland, que corresponde a 5×10^8 UFC / 2 ml.

Se administraron 2 ml a cada animal por vía endotraqueal, de la misma manera que se realizó el desafío viral. Se continuó con la administración de dexametasona a partir de este momento cada tercer día, a dosis de 2 ml por vía intramuscular hasta el día del sacrificio.

CUADRO 1. FASE DE INMUNIZACIÓN EXPERIMENTAL

Calendario de inmunización experimental.

DÍA	TRATAMIENTO	SANGRADO
1	Aclimatación 1a semana	1º Sangrado
7		2º Sangrado
8	Aclimatación 2a semana	3º Sangrado
15		4º Sangrado
17		
19	1a Inmunización con MVs de <i>M.h.</i> A2	5º Sangrado
21		6º Sangrado
23	2a Inmunización con MVs de <i>M.h.</i> A2	7º Sangrado
31	Dexametasona	

CUADRO 2. FASE DE DESAFÍO EXPERIMENTAL

Calendario del desafío experimental.

DÍA	TRATAMIENTO	SANGRADO
33	Dexametasona	
35	Dexametasona	
37	D. con el virus PI3	8º Sangrado
39	Dexametasona	
41	Dexametasona	9º Sangrado
43	Dexametasona	
45	D. Bacteriano con la cepa virulenta de <i>M.h.</i> A2	10º Sangrado
47	Dexametasona	11º Sangrado
49	Dexametasona	12º Sangrado
51	Dexametasona	13º Sangrado
53	Dexametasona	14ºsangrado
55	Dexametasona	15ºsangrado
57	SACRIFICIO	16º Sangrado

D: desafío

VI.18 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

El día 55 se sacrificaron todos los corderos, evaluando simultáneamente la presencia de lesiones neumónicas, así como nódulos linfoides mediastínicos y traqueobronquiales y obtener muestras de pulmón representativas de lesión, de aproximadamente 0.5 cm³, que abarcaron zonas de lesión y zonas de tejido sano, las cuales se fijaron en formalina amortiguada al 10 % para su posterior análisis histopatológico.

VI.18.1 Procesamiento histológico.

Las muestras obtenidas permanecieron en la formalina amortiguada al 10 % aproximadamente una semana, para su adecuada fijación, posteriormente fueron procesadas en histokinett, siguiendo la técnica de deshidratación de rutina para inclusión en parafina y corte a 5 µm para finalmente aplicar técnica de tinción de rutina de H-E ^{136, 137}.

VI.19 Adsorción del suero.

Se obtuvieron sueros negativos contra *M. haemolytica* (suero humano), los cuales se utilizaron para establecer un punto de corte con los sueros positivos a la bacteria, procediendo a su adsorción con la misma.

Se realizó un crecimiento bacteriano en 50 ml de caldo BHI en agitación y se centrifugó a 1200 g/ 20 min. Se resuspendieron las células en Hepes 10 mM pH 7.4 a una concentración 6.8×10^{10} UFC/ml. Se tomaron muestras alícuotas de 200 µl y se centrifugaron en tubos Eppendorf por 10 min. Las células se resuspendieron en 0.5 ml de Hepes y se adicionó suero (inactivado o descomplementado a 56 C por 30 min) al cultivo en la misma proporción. Se mantuvieron interactuando las bacterias y el suero por 90 min. a 4 C. Las muestras del suero con bacterias se centrifugaron en tubos Eppendorf 2 veces por 15 min y se almacenó el sobrenadante a -20 C hasta su uso ¹³⁸.

VI.20 PRUEBA DE ELISA INDIRECTA

Se tomaron 25 µg del antígeno (células completas de *Mannheimia haemolytica* A2) y se resuspendieron en solución de carbonato de sodio-bicarbonato de sodio 100 mM, pH 9.6. Esto se realizó con el fin de sensibilizar la placa toda la noche a - 4 C. Se adicionaron 100 µl del antígeno por pozo y se dejó incubar a - 4 C toda la noche. Se retiró el exceso y se lavaron los pozos 5 veces con PBS-Tween al 0.05%. Se bloquearon las placas con 100 µl de gelatina al 0.5% en PBS – Tween y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 a 60 min. Se retiró el bloqueador y se lavaron los pozos por 5 veces. Se agregaron 100 µl del anticuerpo primario que correspondió al suero de los animales desafiados experimentalmente y se dejó incubar a 4 C toda la noche. Se retiró el exceso y se lavó con PBS-Tween. Se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario peroxidado Anti- IgG y Anti- IgM de borrego (dirigido contra el anticuerpo primario) y se dejó incubar 2 a 3 hrs. a temperatura ambiente. Se retiró el exceso y se lavó 5 veces con PBS-Tween. Se colocaron 100 µl de la sol. Sustrato (10 ml de ABTS + 10 µl de H₂O₂ en Buffer de citrato-fosfato) por pozo y se dejaron incubar de 15 a 20 min., para finalmente medir la absorbancia con un filtro de 405 nm en lector de ELISA¹³⁹.

VI. 21 Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante un programa de computo (MedCalc 9.3.0.0), en donde se llevó a cabo el análisis de medias de los diferentes muestreos serológicos a los que se les aplicó la prueba de ELISA Indirecta. Dicho programa permitió establecer las desviaciones estándar y el análisis de varianza entre los diferentes muestreos.

VII. RESULTADOS.

VII.1 Caracterización de antígenos de MVs: Evaluación *in vitro*

El peso molecular de las bandas en las MVs, fue estimado según su posición en el gel, comparándolo con un estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos, presentes en el mismo gel y mediante un programa de cómputo (GeneTools from SynGene, England; Cambridge). Como lo muestra la **Figura 3**, el programa analizó 11 proteínas de peso molecular que van desde los 270.44 kDa hasta los 6.99 kDa en geles teñidos con Azul de Comassie. Sin embargo, al teñir los geles con tinción de plata para proteínas, se evidenció un número incontable de las mismas en la fracciones de MVs analizadas.

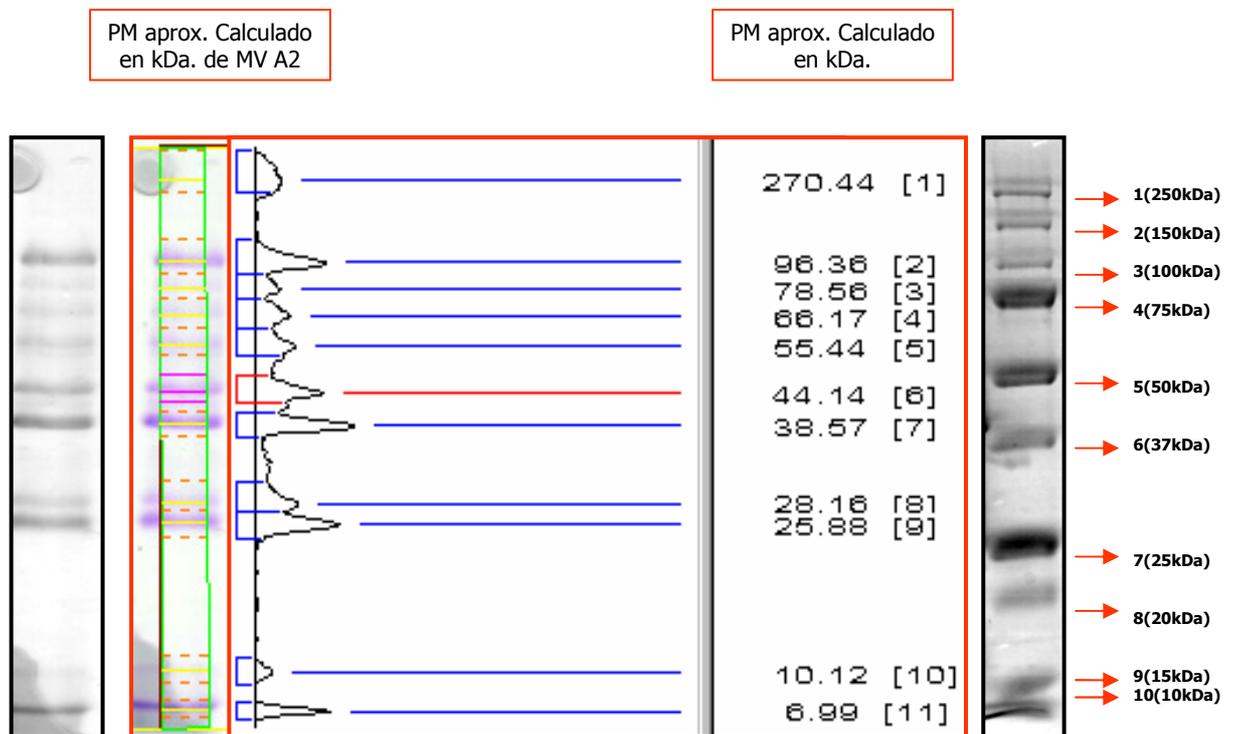


Figura 3. Análisis de imagen mediante software (GeneTools from SynGene, England; Cambridge) de los corrimientos electroforéticos de MVs de *M. haemolytica* A2. Dicho análisis nos permitió establecer los rangos en kDa de proteínas que contienen las MVs de *M. haemolytica* A2. El programa solo detectó 11 proteínas en los geles teñidos con azul de Comassie.

VII.2 SDS-PAGE. (Cinética de obtención de MVs).

Las características de crecimiento de *M. haemolytica* así como el tipo de producción de MVs, permitieron establecer a partir de la cinética de producción de MVs, que el mejor tiempo de cultivo y producción de las mismas era de 24 hrs., con una concentración de gentamicina de 20 µg/ml de cultivo bacteriano (**Figura 4**). Por lo que se procedió a obtener las MVs de *M. haemolytica* A2, comprobando dichos parámetros mediante SDS-PAGE y observación al microscopio electrónico (Jeol; modelo: JEM2000EX). De esta manera fue posible la identificación de las principales proteínas antigénicas de la bacteria (**Carril 4- Fig. 4**), como son la leucotoxina (LKT) de 104 kDa, una proteína de 60 kDa que cruza antigénicamente con una adhesina de *A. pleuropneumoniae*, dos proteínas de 45 y 54 kDa identificadas en un trabajo previo como altamente antigénicas⁷⁶ y el LPS de 20 kDa.

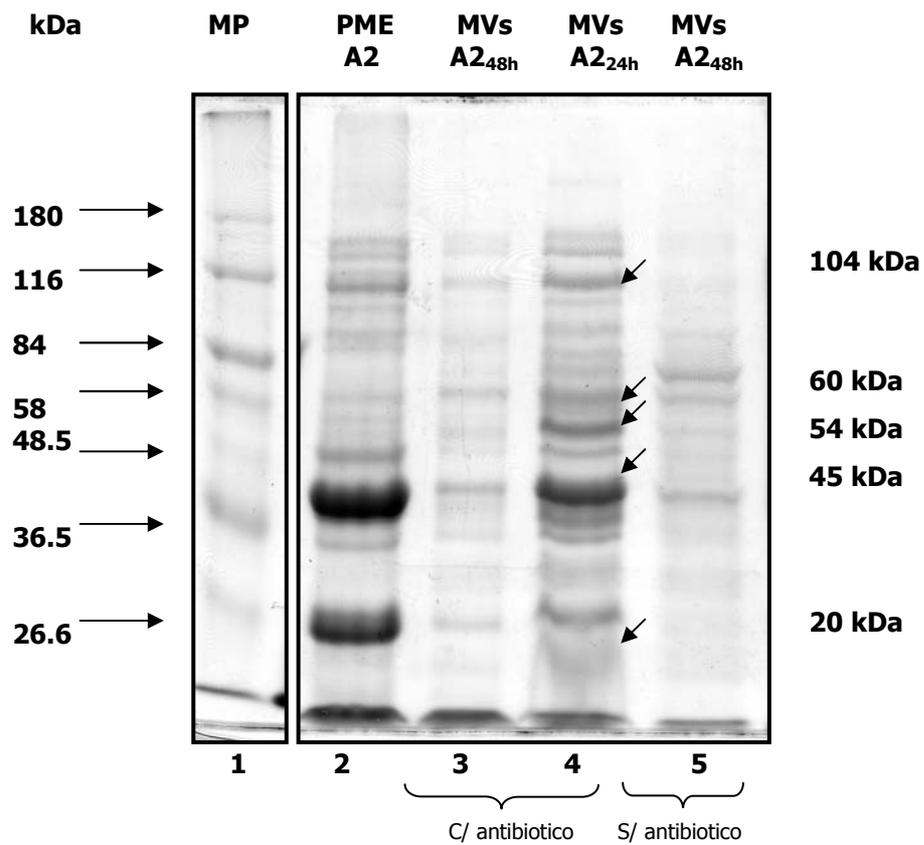


Figura 4. SDS- PAGE al 12.5% de las PME y las MVs obtenidas a partir de la cinética de extracción con antibiótico. En el primer carril se observan los marcadores de peso molecular, en el segundo carril se encuentran las PME de *M.h* A2, el carril 3 corresponde a MVs de *M.h* A2 obtenidas a las 48 hrs y en el carril 4 MVs obtenidas a las 24 hrs., en ambos casos se utilizaron 20 µg de gentamicina. Sobre de este último carril, se marcan las principales proteínas antigénicas de la bacteria. En el carril 5 se observan las MVs obtenidas a las 48 hrs. sin antibiótico.

VII.3 SDS-PAGE.

Las proteínas de membrana externa (PME) y de MVs tanto del serotipo A1 (National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa 50010) como del serotipo A2 (cepa de campo) fueron separadas mediante SDS-PAGE al 12%. De cada corrimiento se realizaron 2 geles, uno fue teñido con azul de Coomassie y el otro se tiñó con plata o bien se utilizó para realizar la inmunotransferencia (**Fig. 8 y 9**). Las muestras de PME así como de MVs, se corrieron en el mismo gel al 12%, para determinar los patrones proteínicos tanto de la fracción de membrana externa así como de las MVs, observándose entre ellas una gran similitud en cuanto a cantidad de bandas proteínicas que comparten dichas estructuras (**Fig 5**). En la mayoría de los casos se utilizó como control una cepa de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (*Ap1*).

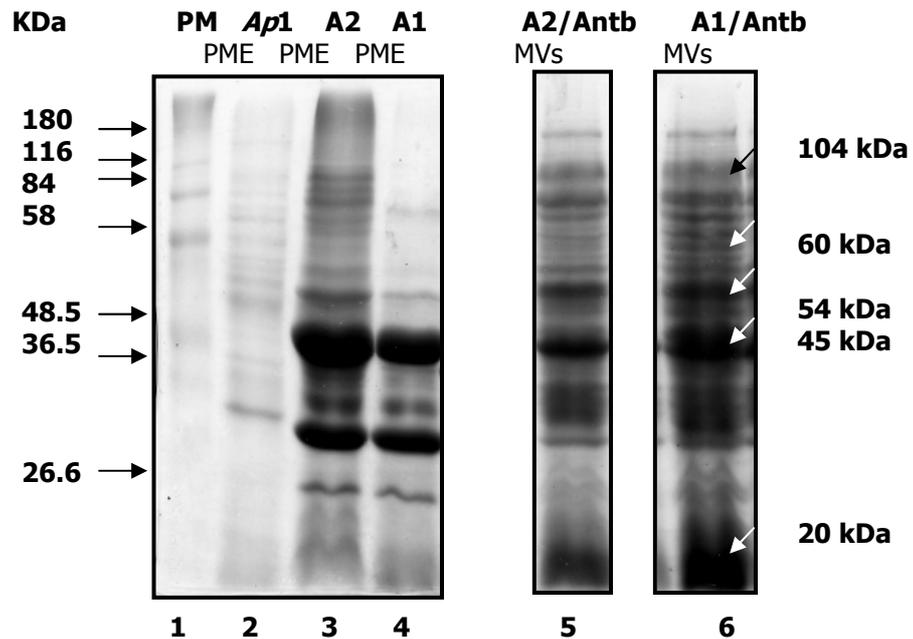


Figura 5. SDS-PAGE al 12% de las PME y MVs de *M. haemolytica*, teñidos con azul de Coomassie. En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular, en el carril 2 se aprecian las PME de *A.p1*, la cual se utilizó como control., posteriormente en los carriles 3 y 4, se aprecian las PME de *M. haemolytica* A2 y A1 respectivamente. El patrón proteínico de esta fracción, comparte una gran cantidad de bandas con las MVs de sus respectivos serotipos; carriles 5 y 6. Ambas corresponden a MVs extraídas de cultivos tratados con antibiótico (Antb), sobre del último carril se marcan con flechas las principales proteínas antigénicas identificadas en MVs.

Se estableció mediante tinción de plata para proteínas, que tanto el serotipo A1 como el serotipo A2 de *M. haemolytica* comparten numerosas proteínas, siendo éstas mucho más evidentes con dicha tinción (**Fig 6**).

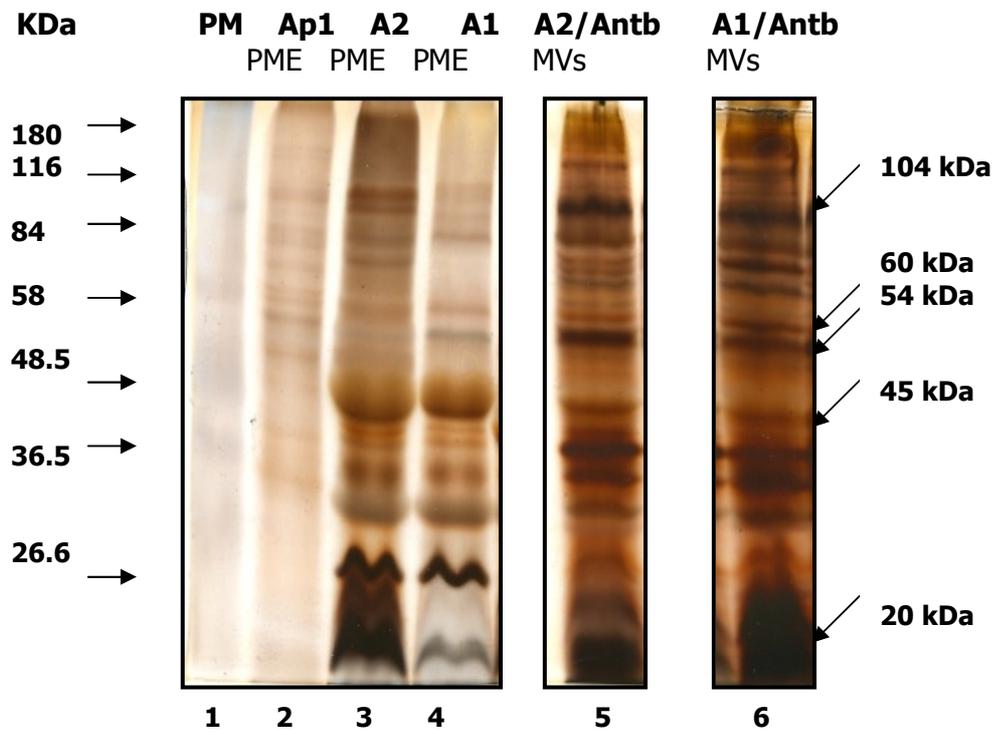


Figura 6. SDS-PAGE al 12% de las PME y MVs de *M. haemolytica*, teñidas con plata. Se realizó tinción de plata, tanto de las PME, como de las MVs del serotipo A2 y A1, evidenciándose aún más, las proteínas que comparten dichas fracciones en ambos serotipos. Como en las imágenes anteriores, sobre del último carril se marcan con flechas las principales proteínas antigénicas identificadas en MVs teñidas con plata.

Una vez obtenidas las fracciones de membrana externa así como las respectivas microvesículas de cada serotipo, se procedió a determinar la presencia de LPS en ambas estructuras mediante tinción de plata modificada para LPS. Como se puede apreciar en la imagen (**Fig. 7**), tanto las fracciones de membrana externa así como de microvesículas, presentan LPS, el cual se observa en los fondos de los carriles a nivel de los marcadores de 10 a 15 kDa en color oscuro. En el caso de las MVs, en algunos casos se tiñe la parte superior del carril por contener componentes de la membrana externa, ofreciendo una reacción positiva a la tinción en la parte superior del corrimiento (**Fig. 7, carril 4**)

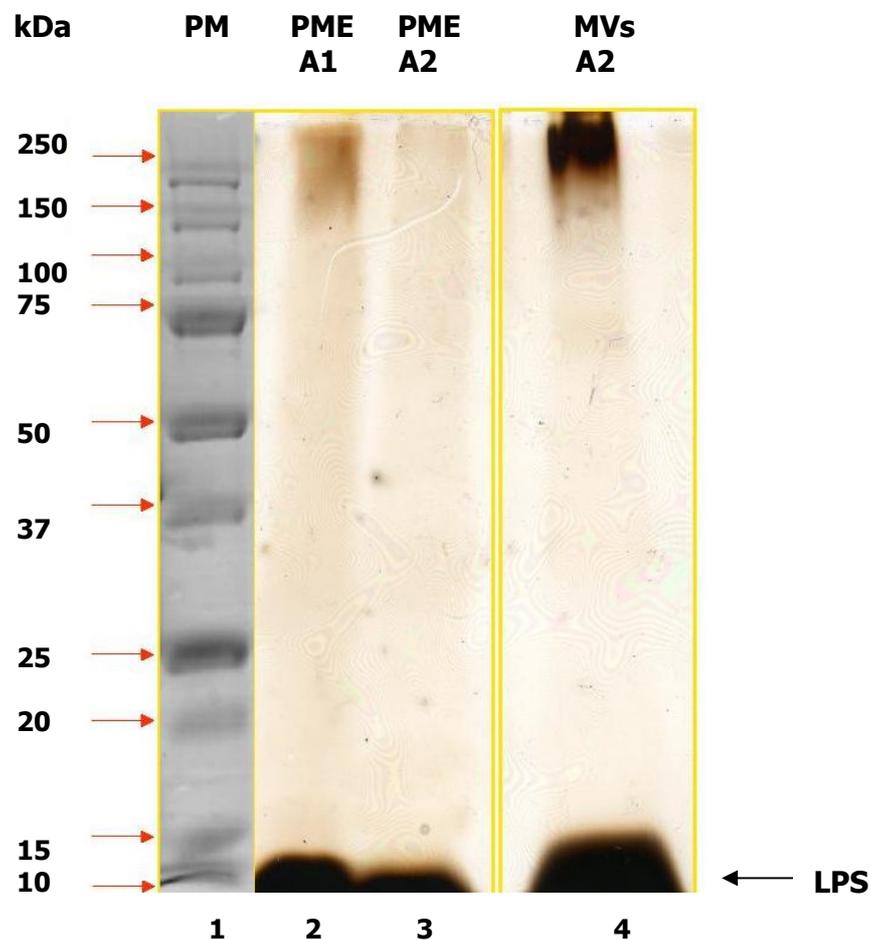


Figura 7. SDS-PAGE al 12% del LPS de las PME y de MVs de *M. haemolytica*.

En el primer carril se observan los marcadores de peso molecular, en el 2º y 3º carril se aprecia el corrimiento de la fracción de membrana externa tanto de serotipo A1 como del serotipo A2 respectivamente, en donde se aprecia en el fondo de los mismos en un color oscuro al LPS. En el carril 4, se observa un corrimiento de MVs de *M.h* serotipo A2, en donde se tiñe del mismo tono el LPS en el fondo del carril a nivel de los marcadores de 10 a 15 kDa.

VII. 4 Western Blot (Inmunotransferencia).

Se realizó el inmunoblot de las fracciones de membrana externa con sus respectivas microvesículas, tanto del serotipo A1 como del A2, enfrentándolos con sueros de animales clínicamente enfermos y clínicamente sanos. En ambos casos se observó una intensa reacción de reconocimiento a las microvesículas, principalmente a las MVs del serotipo A2, en cuyo caso es importante mencionar que la mayoría de los corderos "clínicamente sanos" muestreados en campo, presentan una gran cantidad de anticuerpos contra los antígenos de *M. haemolytica* específicamente al serotipo A2 (Fig. 8).

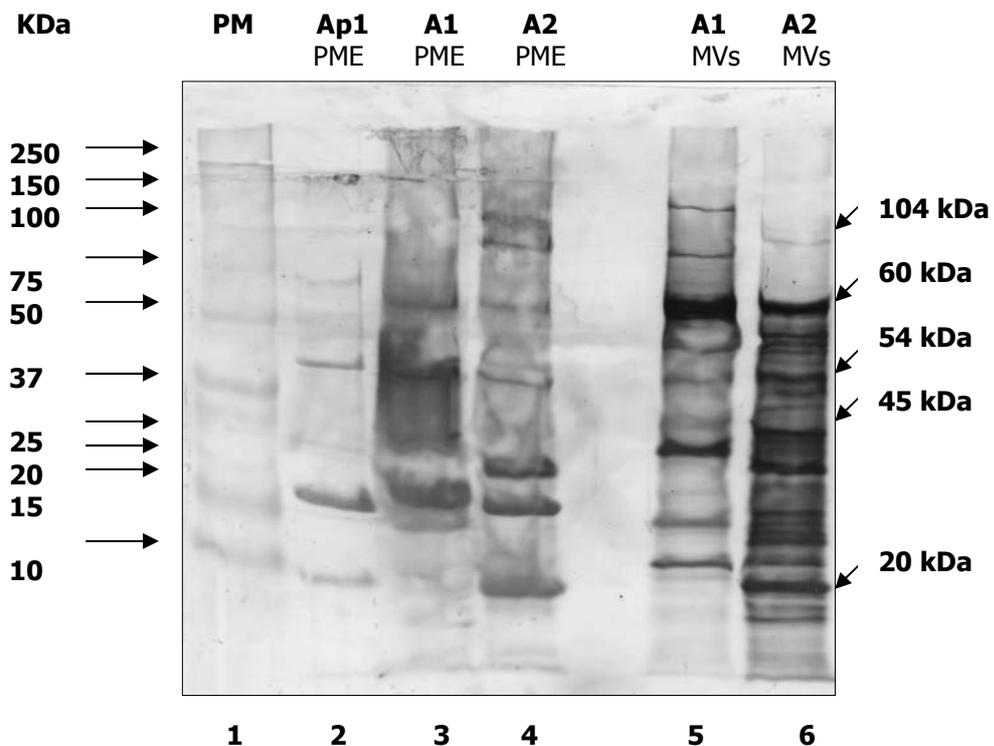


Figura 8. Western Blot con suero de corderos "clínicamente sanos", muestreados en campo. En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular, en el carril 2 se utilizaron PME de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (*A.p* 1) utilizada como control, en los carriles 3 y 4 se observan las PME de los serotipo A1 y A2, respectivamente y finalmente en los carriles 5 y 6 se aprecian las proteínas de las microvesículas tanto del serotipo A1 como del serotipo A2 respectivamente.

Para determinar la presencia de la leucotoxina (LKT) en las microvesículas, se procedió a utilizar un suero anti-Apx1 de *A. pleuropneumoniae*, dado que dicha bacteria posee una hemolisina, de un peso (105 kDa) y estructura de RTX muy similar a la LKT de *M. haemolytica* (**Fig. 9**). Sobre el Inmunoblott, se observa claramente una banda ligeramente por arriba del marcador de 100 kDa, que esta siendo reconocida por el suero anti - APx1 de *A. pleuropneumoniae*, la cual podría corresponder a la leucotoxina de *M. haemolytica* dando esto una reacción cruzada positiva (**Fig 9. carril 2 y 3**).

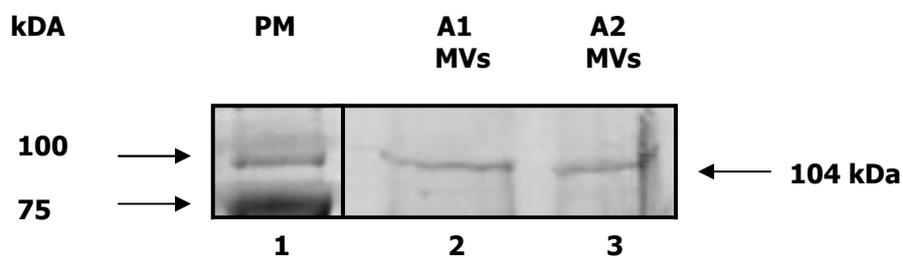


Figura 9. Western Blot con un suero anti - Apx1 de *A. pleuropneumoniae* reacción cruzada con LKT. En el primer carril se aprecian los marcadores de peso molecular y en los carriles 2 y 3 observamos MVs de los serotipos A1 y A2 de *M. haemolytica* respectivamente, en donde se aprecia una banda ligeramente por arriba del marcador de 100 kDa, que corresponde a la LKT, de la bacteria.

Otro de los sueros que se probaron con al técnica de inmunoblott transfiriendo MVs tanto del serotipo A1 como del serotipo A2 de *M. haemolytica*, fue un suero anti - Adhesina conteniendo anticuerpos contra una proteína de 60 kDa de *A. pleuropneumoniae* previamente identificada en dicho agente ¹⁴⁰ (**Fig. 10**). En este caso se observó un claro reconocimiento sobre una proteína de peso similar en las MVs de *M. haemolytica*. En ambos casos se observa claramente el reconocimiento de una banda que se encuentra entre el marcador de 50 y 75 kDa, la cual reaccionó con el suero anti - Adhesina (60 kDa) de *A. pleuropneumoniae*, la cual podría corresponder a una proteína de estructura similar en *M. haemolytica* A2 (**Fig. 10, carril 2 y 3**).

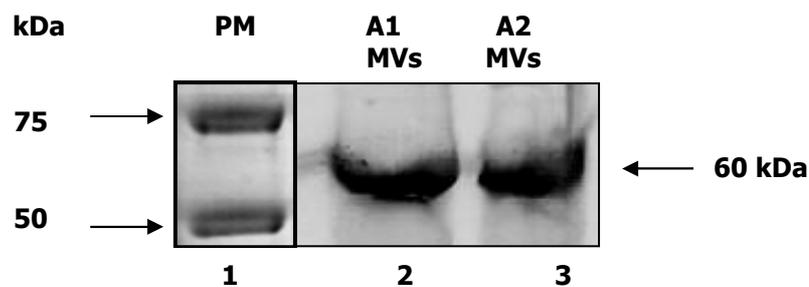


Figura 10. Western Blot con suero anti-Adhesina de 60 kDa de *A. pleuropneumoniae*, reacción cruzada con *M. haemolytica*. En el primer carril se encuentran los marcadores de peso molecular y en los carriles 2 y 3 observamos MVs del serotipo A1 y A2 de *M. haemolytica* respectivamente.

VII. 5 Eliminación del plásmido.

Una vez eliminado el plásmido de resistencia, se procedió a hacer electroforesis en geles de agarosa al 1%, para determinar la presencia o ausencia de dicha estructura, a partir de cepas tratadas con naranja de acridina y cepas sin el tratamiento (**Fig. 11**).

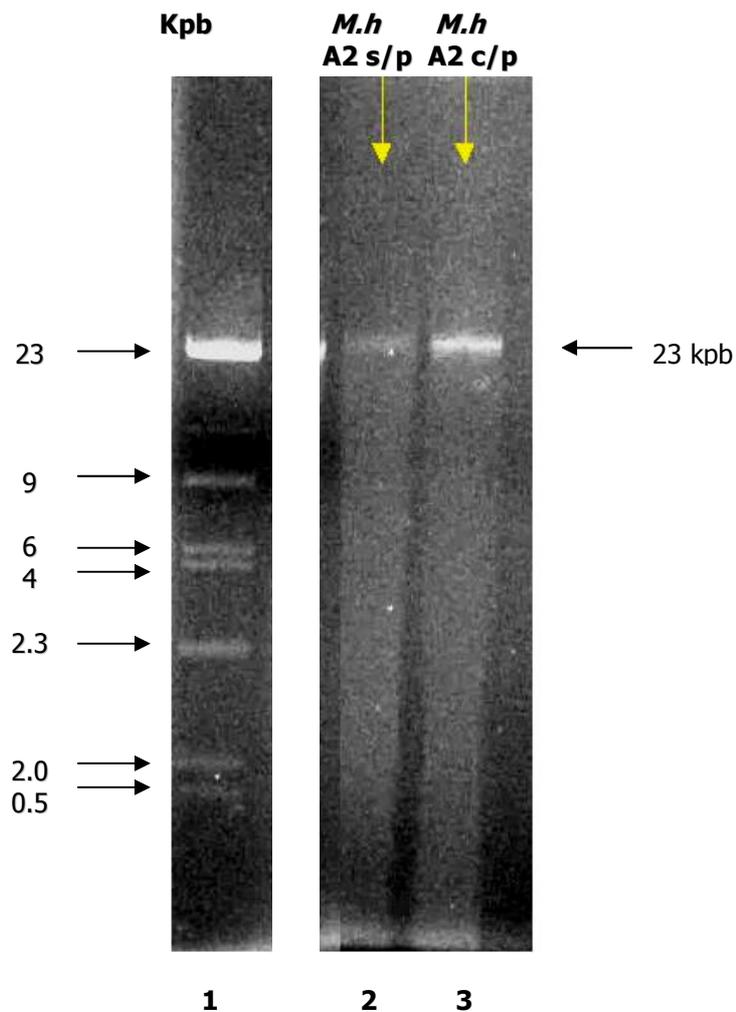


Figura 11. Gel de agarosa al 1% para observar DNA de MVs de *Mannheimia haemolytica*. En el primer carril se encuentran los marcadores de tamaño y en el carril 2 observamos una muestra de MVs de *M. haemolytica* serotipo A2 tratada con Naranja de Acridina y en el carril 3 una muestra de MVs del serotipo A2 sin tratamiento con Naranja de Acridina.

VII. 6 Microscopía Electrónica.

La observación de las bacterias con MVs en los diferentes campos al microscopio electrónico (Jeol; modelo: JEM2000EX), reveló la presencia de estructuras de tamaño regular y de forma esférica que pudieran sugerir coalescencia de microvesículas (**Fig. 12**), Es claro a su vez la formación de múltiples MVs emanando de la superficie bacteriana, en donde se aprecia claramente la doble membrana característica de las mismas. En otros casos, se observaron numerosas MVs desprendiéndose de la membrana externa de la bacteria así como a lo largo de la bacteria (**Fig. 13**).

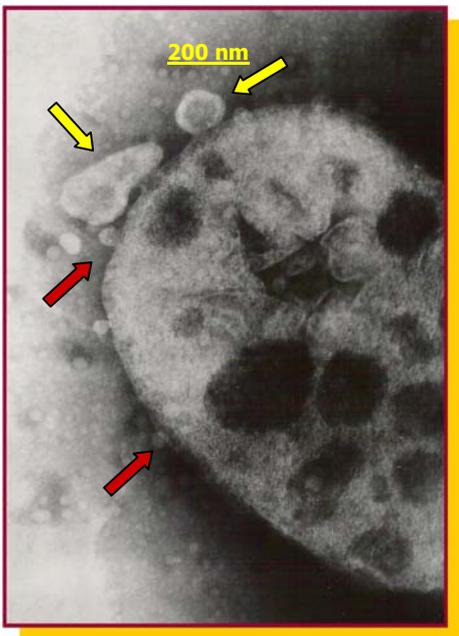


Figura 12.

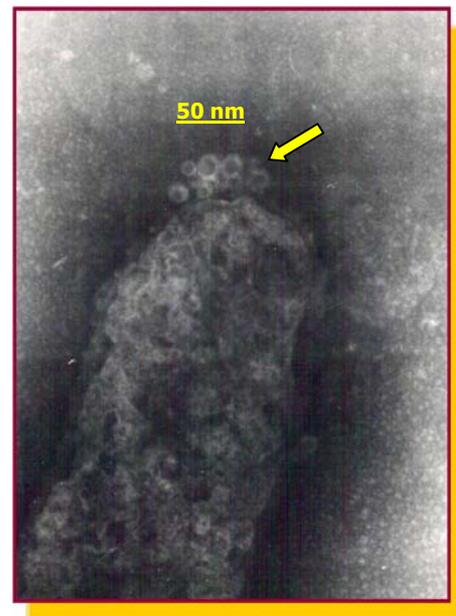


Figura 13.

Tinción Negativa de MVs de *M. haemolytica* A2.

Figura 12. En la imagen se aprecia el cuerpo bacteriano de *M. haemolytica* liberando múltiples estructuras esféricas de aproximadamente 100 nm de diámetro (flechas rojas). Dichas estructuras tienden a coalescer para formar estructuras de mayor tamaño (200 nm) (flechas amarillas).

Figura 13. Se observa un cúmulo de MVs, en una de los polos del cuerpo de la bacteria (flecha amarilla), siendo la mayoría de ellas de tamaño uniforme con una halo muy claro a su periferia que denota la doble membrana (50nm).

VII. 7 ELISA INDIRECTA.

La prueba de ELISA indirecta, se realizó considerando como títulos basales de IgG e IgM, aquellos determinados durante el primer muestreo dado que los ovinos, no son animales libres de *Mannheimia haemolytica*. Como se ha mencionado anteriormente, ésta bacteria reside en vías respiratorias superiores (tonsilas) y bajo estímulo de inmunosupresión, prolifera y culmina con la invasión del pulmón. Por lo tanto, al carecer de animales libres de la bacteria, partimos nuestra evaluación inmunológica del título obtenido durante la primera semana de aclimatación (**Figura 14**). Es importante mencionar que no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre las medias de las IgGb (b=basales) y las IgMb muestreados en los diferentes grupos así como entre grupos.

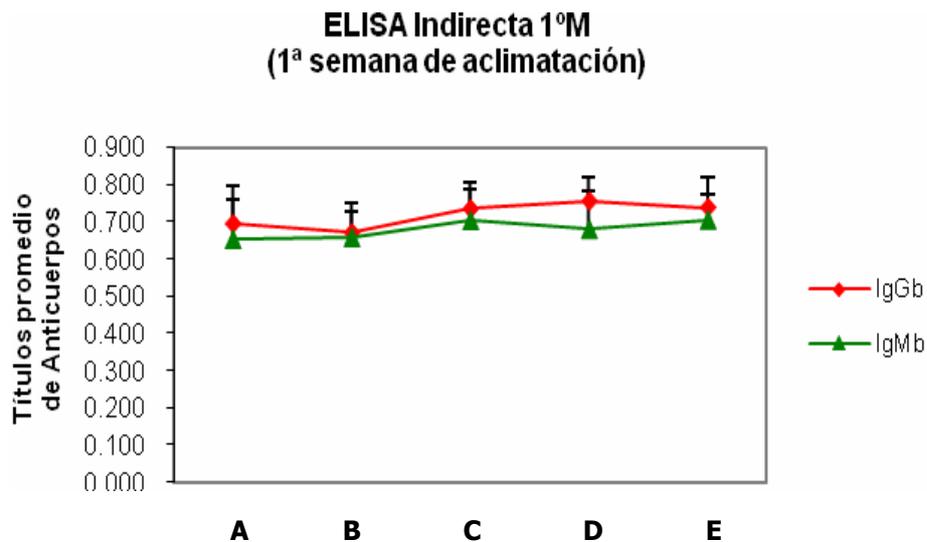


Figura 14. Títulos basales (b) de IgG e IgM en los cinco grupos a evaluar.

Grupo A: Animales vacunados por vía I.M con la vacuna comercial, Grupo B: animales vacunados vía intranasal, Grupo C: Animales del grupo control. Grupo D: Animales vacunados por vía I.M con MVs y Grupo E: animales vacunados con PME vía I.M.

b: basales

Es durante la segunda semana de aclimatación, que los títulos de IgG se elevan ligeramente por arriba de las IgM (**Figura 15**) y por ende de los títulos basales previamente establecidos en el primer muestreo (IgG b e IgM b). Es importante mencionar que no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre las medias de las inmunoglobulinas del 4º y las medias de las IgG e IgM basales., excepto en el grupo B, en donde se observó diferencias significativas ($P<0.05$) entre las IgG del 1ºM con respecto al 4º muestreo.

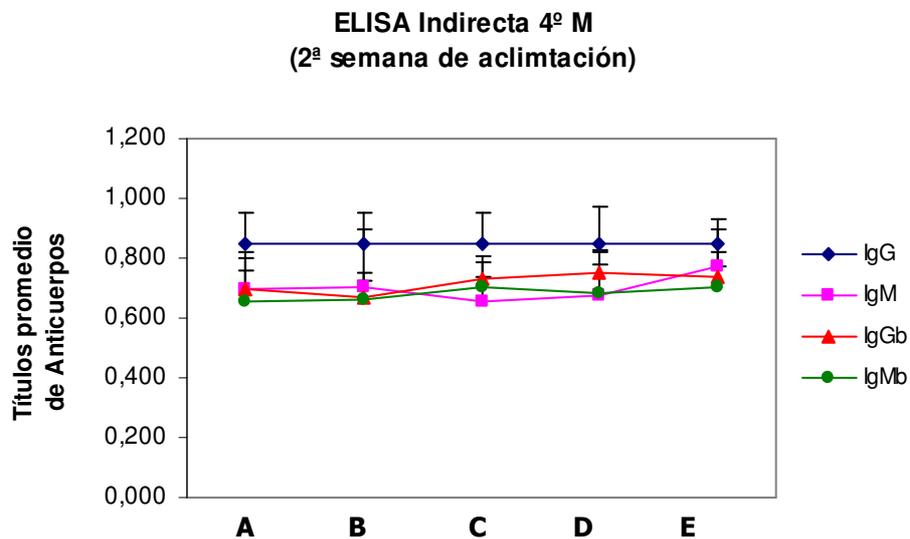


Figura 15. Comparación de la respuesta inmune entre los títulos basales y los obtenidos en la 2ª semana de aclimatación. Las IgG del segundo muestreo se

elevaron por arriba de las IgM y de las inmunoglobulinas basales del primer muestreo. Solo en el grupo B, se observó diferencias significativas ($P<0.05$) entre las IgG del 1ºM con respecto al 4º M

b: basales

Durante el 5^o y 7^o muestreo (**Figuras 16 y 17**), los cuales correspondieron a la 1^a y 2^a inmunización, se pudo observar una marcada respuesta de las IgM ($p < 0.05$) con respecto a las IgG y al muestreo basal. La respuesta inmune primaria por considerarla así dentro del experimento, esta dada por las IgM circulantes. Entre las IgM y las IgG del grupo B, C, D y E del 5^o muestreo, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$). Lo mismo sucedió entre las IgM e IgG del 5^o muestreo con respecto al muestreo basal, donde también hubo diferencias significativas entre dichos muestreos ($p < 0.05$).

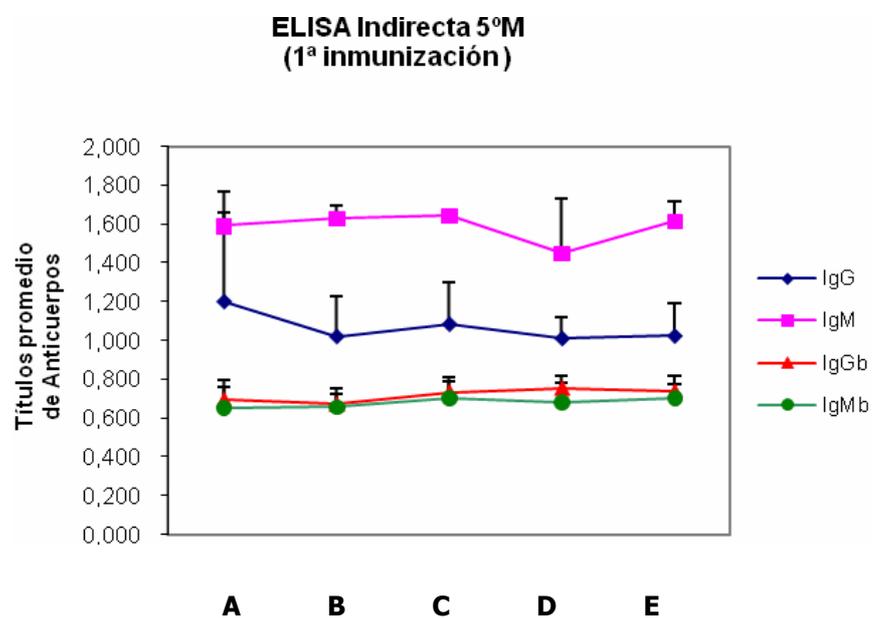


Figura 16. 1^a inmunización con los diferentes tratamientos inoculados por diferentes vías. Entre las IgM y las IgG del grupo B, C, D y E del 5^o muestreo, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$). Lo mismo sucedió entre las IgM e IgG del 5^o muestreo con respecto al muestreo basal, donde hubo diferencias significativas entre dichos muestreos ($p < 0.05$).

b: basales

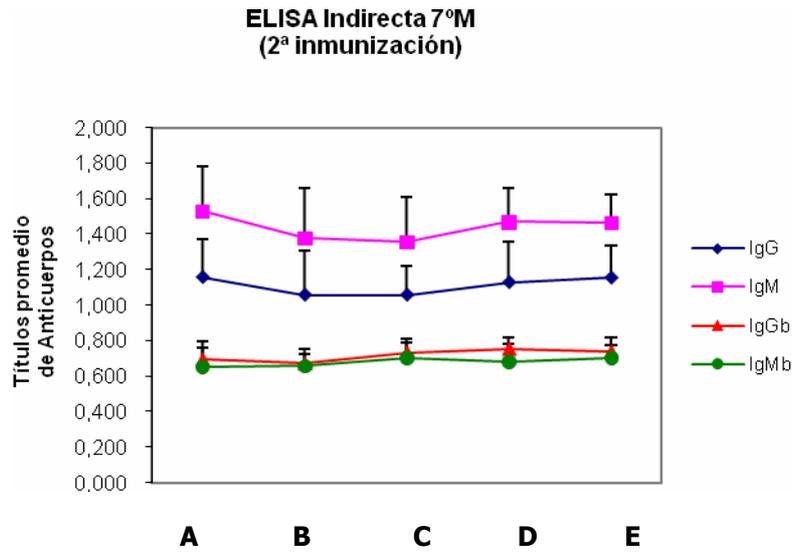


Figura 17. 2^a inmunización con los diferentes tratamientos inoculados por diferentes vías. Entre las IgM y las IgG del grupo A, C, D y E del 7^o muestreo, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$). Lo mismo sucede entre el 7^o muestreo con respecto al muestreo basal ($p < 0.05$).

b: basales

Una vez inmunizados los corderos de los diferentes grupos, se procedió a la inoculación del virus (PI3), quien fungió como agente primario inmunosupresor, dada la fisiopatología de la enfermedad. En este punto se mantuvo la respuesta de las IgM, por arriba de las IgG. Es evidente la respuesta del 8º muestreo, que quedo muy por arriba del muestreo basal haciéndolo de esta manera, significativamente diferente ($p < 0.05$).

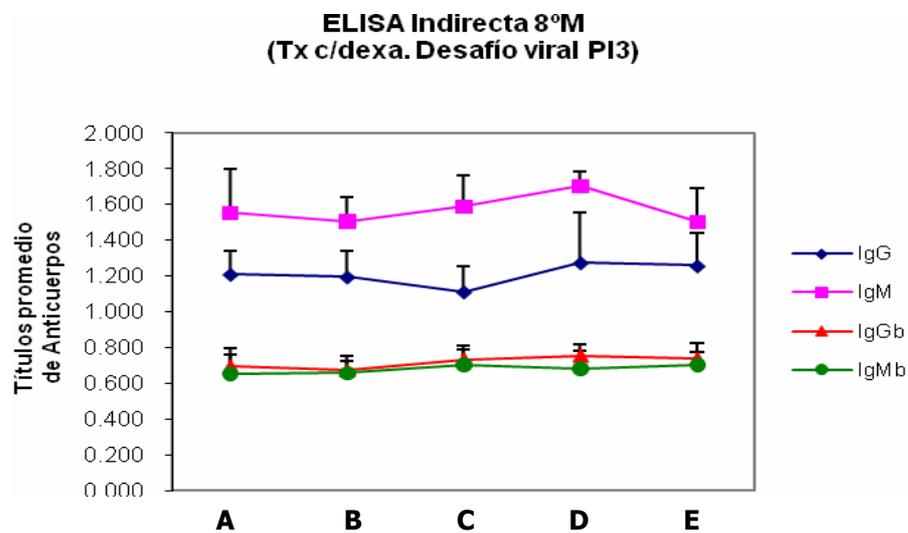


Figura 18. 1º Desafío con virus vivo de PI3, tratamiento paralelo con dexametasona. Entre las IgM y las IgG del grupo A, B, C y D del 8º muestreo, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$). Observándose de la misma manera, las diferencias ($p < 0.05$) entre las inmunoglobulinas del 8º muestreo con respecto al muestreo basal.

b: basales

Como lo muestra la gráfica (**Figura 19**), las IgM continúan por arriba de las IgG. Es importante recordar, que se trataron a los animales a partir del día 31 con dexametasona así como también se desafiaron con PI3, obligando así al sistema (IgG) a mantenerse por debajo de la respuesta, para favorecer la colonización de la bacteria en el órgano blanco durante el desafío bacteriano con la cepa virulenta de campo, lo cual pudiera desencadenar este tipo de respuesta inmune.

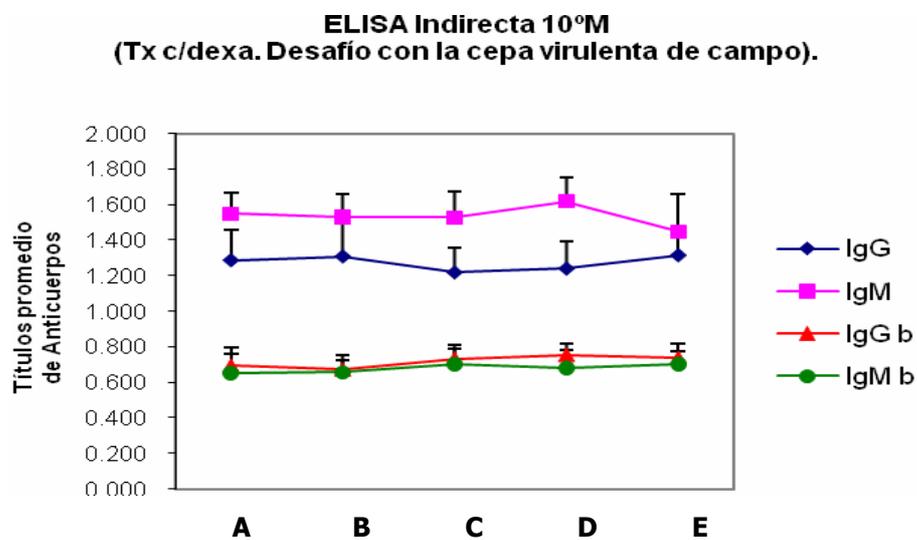


Figura 19. 2^o Desafío con una cepa de campo virulenta de *M.*

***haemolytica* A2, tratamiento paralelo con dexametasona.** Entre las IgM y las IgG del grupo A, C, D y E del 10^o muestreo, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$). Observándose de la misma manera, las diferencias ($p < 0.05$) entre las inmunoglobulinas del 10^o muestreo con respecto al muestreo basal.

b: basales

Es en este muestreo, en el que finalmente se observa una ligera curva de IgG que pasa muy cerca da la respuesta de las IgM. La respuesta de las IgG, no es del todo contundente con respecto a la doble inmunización como era de esperarse, ya que posterior al muestreo 14^o, la respuesta inmune vuelve a ser dominada por las IgM (**Figura 20**). Entre las IgG e IgM del 14^o muestreo no hubo diferencias significativas ($p>0.05$). Es posible que el sistema inmune, a pesar del estado de estrés constante (Inmunización con PI3 y tratamiento con dexametasona), haya respondido lo suficiente como para haber generado este tipo de respuesta, la cual a pesar de no ser tan evidente estadísticamente, protegió del desarrollo de lesiones características de la pasteurelisis neumónica en los grupos A y D, no así para el resto de los grupos tratados.

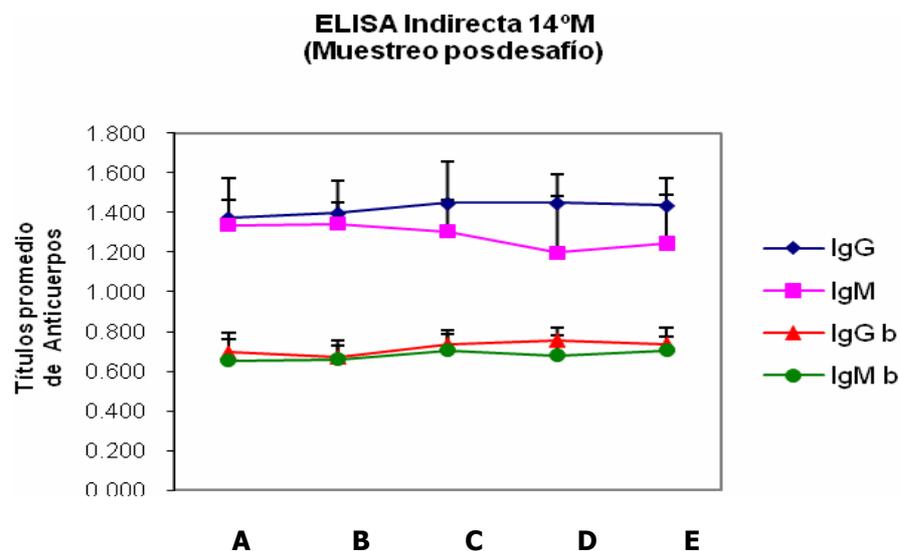


Figura 20. Comparación del muestreo 14^o posdesafío, con respecto al título basal. Entre las IgG y las IgM de todos los grupos del muestreo 14^o, no hubo diferencias significativas ($p>0.05$). Sin embargo, se observa claramente, las diferencias significativas ($p<0.05$) que hubo entre el 14^o muestreo con respecto al muestreo basal.

b: basales

Posterior al muestreo 14^o, las IgM, volvieron a dominar la respuesta generando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los títulos de IgM con respecto a las IgG. De la misma manera se puede apreciar una respuesta muy similar ($p < 0.05$) entre el muestreo 16^o y el basal. No podemos descartar, que la respuesta se halla visto influenciada por factores externos a la evaluación *in vivo*, como pudieran haber sido los cambios de clima, o bien la reactivación de *Mannheimias* comensales de vías respiratorias altas en los momento de mayor estrés e inmunosupresión (1^o y 2^o semana de aclimatación y durante el desafío viral y bacteriano) Recordando que aún y cuando los títulos de IgG e IgM fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) con respecto a los basales, no en todos los casos, esto se tradujo en una respuesta protectora.

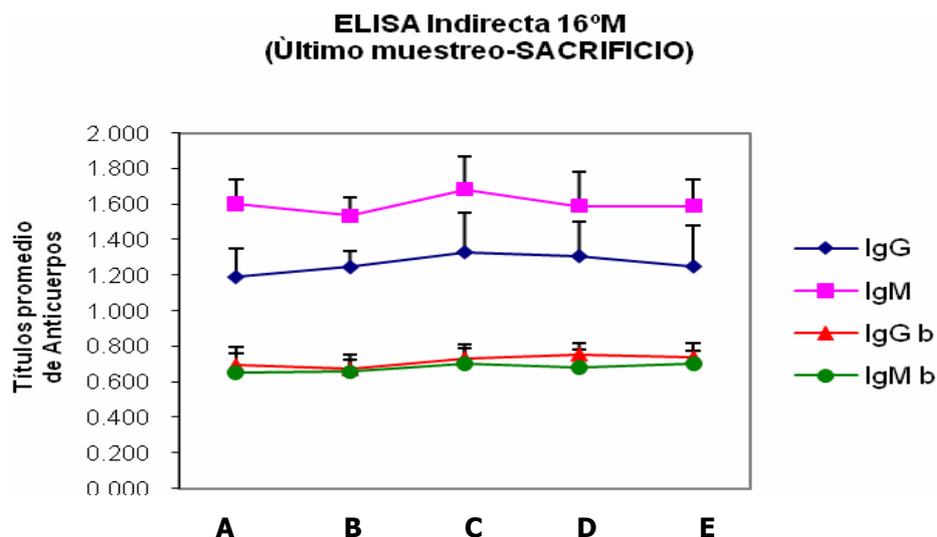


Figura 21. Último muestreo posdesafío con *M. haemolytica* A2. Entre las IgM y las IgG de todos los grupos hubo diferencias significativas ($p < 0.05$), al igual que los títulos de las inmunoglobulinas del 16^o muestreo con respecto a los basales ($p < 0.05$).

b: basales

De manera general, los títulos de IgG en los diferentes grupos tratados durante el desarrollo de la evaluación *in vivo*, mostraron un comportamiento ascendente, con respecto al título basal. Los títulos de IgG se fueron elevando conforme se realizaron los diferentes tratamientos según lo muestra el **Cuadro 1 y 2**. A pesar de la presión que se ejerció al sistema inmune, (estrés de manejo, desafío viral y tratamiento con dexametasona), las IgG, respondieron a los antígenos inoculados por las diferentes vías. Aún cuando los picos de respuesta no son muy evidentes (**Figura 22**), dado que los animales ya presentan cierta respuesta a la bacteria, los títulos de IgG tanto del grupo A como del grupo D, protegieron contra el desarrollo de lesiones, no así para el resto de los grupos, quienes a pesar de responder de manera similares al grupo A y D, desarrollaron lesiones características a la pasteurelisis neumónica.

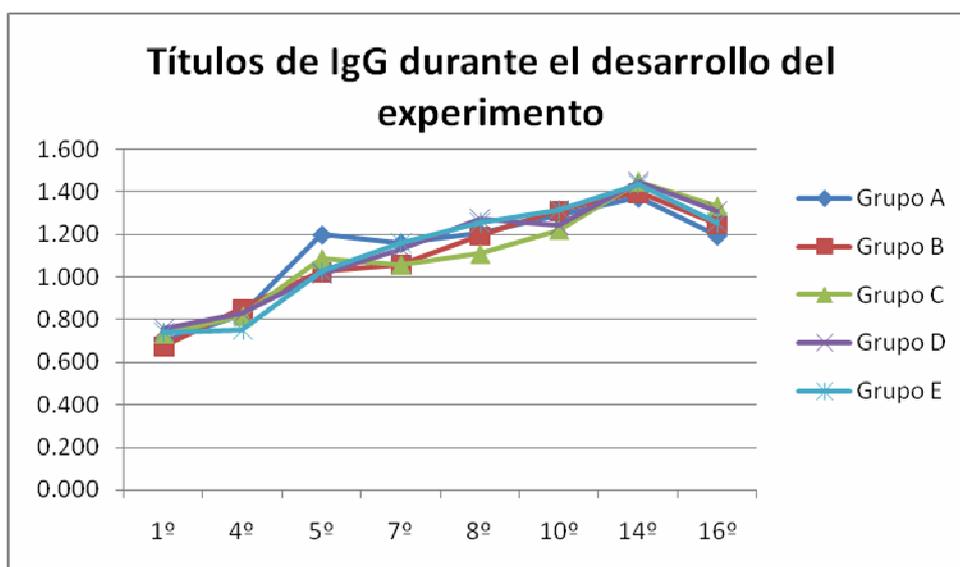


Figura 22. Comportamiento general de los títulos de IgG durante el desarrollo de la evaluación *in vivo*. Grupo A: Animales vacunados por vía I.M con la vacuna comercial, Grupo B: animales vacunados vía intranasal, Grupo C: Animales del grupo control. Grupo D: Animales vacunados por vía I.M con MVs y Grupo E: animales vacunados con PME vía I.M.

1°: Título basal

En el caso de la IgM, la respuesta general de estas inmunoglobulinas, con respecto a las IgG, mostraron un patrón muy diferente. Es evidente en la gráfica, que entre el 4° y el 5° muestreo, la respuesta se dispara. Las IgM, son las inmunoglobulinas de la respuesta primaria ante el antígeno y muy probablemente en éste período es cuando éstas se activaron. A partir del 5° muestreo, la respuesta se mantuvo con ligeras ondulaciones y fue hasta el 14° muestreo posdesafío con la cepa de campo virulenta de *M. haemolytica*, cuando descienden notablemente, para dar paso a la respuesta de IgG y finalmente vuelven a ascender.

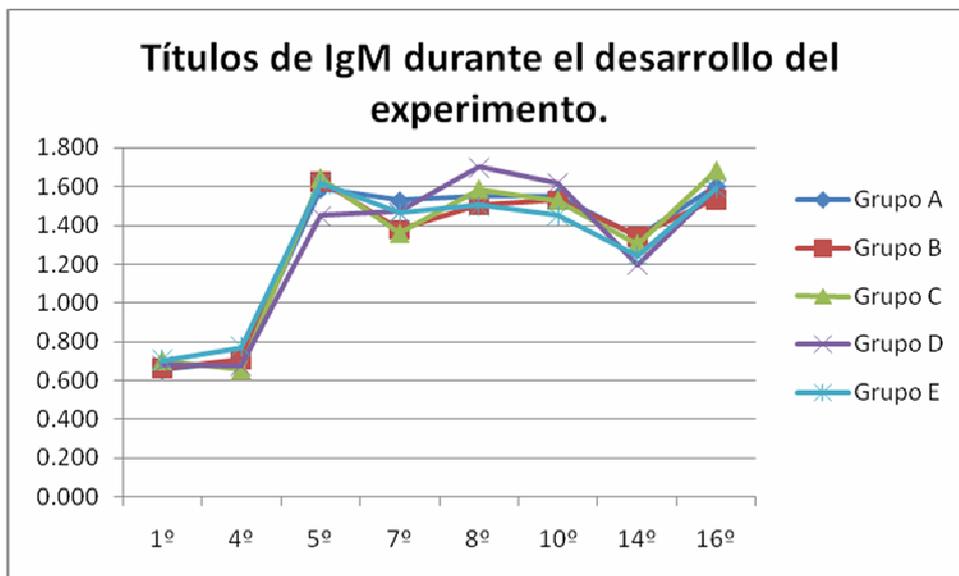


Figura 23. Comportamiento general de los títulos de IgM durante el desarrollo de la evaluación *in vivo*. Grupo A: Animales vacunados por vía I.M con la vacuna comercial, Grupo B: animales vacunados vía intranasal, Grupo C: Animales del grupo control. Grupo D: Animales vacunados por vía I.M con MVs y Grupo E: animales vacunados con PME vía I.M.

1°: Título basal

VII. 8 Resultados de la evaluación al sacrificio.

VII. 8.1 Necropsia.

Se realizó la necropsia de todos los grupos, al día 55 del calendario de desafío (**Cuadro 2**). Se procedió a la inspección macroscópica del aparato respiratorio dentro de la cavidad torácica que incluyó: determinación de posibles adherencias entre los lóbulos pulmonares y las paredes de la cavidad. Una vez fuera, el aparato respiratorio fue inspeccionado en sus superficies pulmonares, revisando principalmente posibles cambios de coloración que podrían incluir cambios vasculares o bien engrosamientos de pleura pulmonar, sin descartar aquellas lesiones que incluían consolidación que al corte penetraban el parénquima. Se revisó la luz de la tráquea, haciendo un corte sobre la misma en su unión membranosa que iba desde faringe, laringe y tráquea hasta lo más profundo del árbol bronquial. La inspección incluyó la revisión detallada de nódulos linfoides traqueobronquiales y mediastínicos haciendo un corte longitudinal por su curvatura mayor, exponiendo así corteza y médula.

La lesión que prevaleció en la mayoría de los casos, fue la Neumonía Intersticial (**Figura 24**), distribuida craneoventralmente, la cual se caracterizó por el engrosamiento de la pleura con una distribución que iba de multifocal a difusa, acompañada de cambios vasculares que incluían hemorragias petequiales y/o congestión vascular. En otros casos, sobre estas lesiones se desarrollaron neumonías agudas de tipo lobar o bien neumonías fibrinopurulentas, (**Figuras 25, 26 y 27**); en ambos casos distribuidas craneoventralmente, con cambios vasculares evidentes que incluían hemorragia y congestión (**Figura 28**). En estos casos en particular se observó a la inspección de tráquea, que la luz se encontraba ocupada por la presencia de un líquido espumoso que iba de blanquecino a rojizo, obstruyendo todo lo largo de la tráquea hasta llegar al árbol bronquial.

Las adherencias prevalecieron en un 90% de los casos, fueron de moderadas a severas e incluían la adherencia entre los lóbulos pulmonares y la pared torácica, entre los mismos lóbulos o bien entre lóbulos y corazón. En este último caso, las adherencias llegaron a desarrollar engrosamiento del saco pericárdico (**Figuras 29, 30 y 31**).

Finalmente se revisaron cuidadosamente los nódulos linfoides mediastínicos y traqueobronquiales. Externamente se revisó su tamaño y forma, para posteriormente realizar un corte longitudinal en su parénquima permitiendo así la inspección de corteza y médula (**Figuras 32 y 33**). En el **Cuadro 3**, se resumen las lesiones que prevalecieron durante la inspección macroscópica, detallando el grado de severidad (leve, moderado y severo) encontrado en los diferentes grupos evaluados.



Fig. 24. Neumonía intersticial.

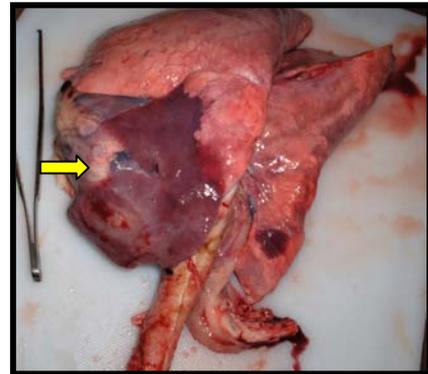


Fig. 25. Neumonía lobar aguda severa.

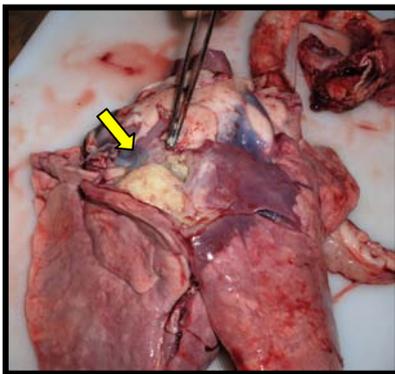


Fig. 26. Neumonía fibrinopurulenta focal aguda severa.

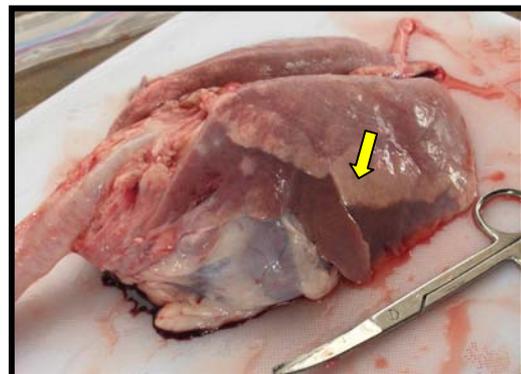


Fig. 27. Neumonía lobar aguda severa.

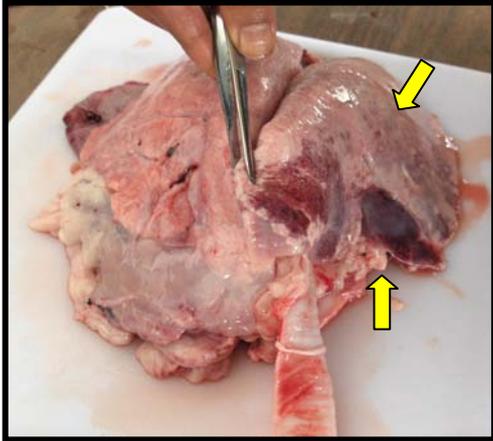


Fig.28. Hemorragias petequiales y sufusiones multifocales severas.

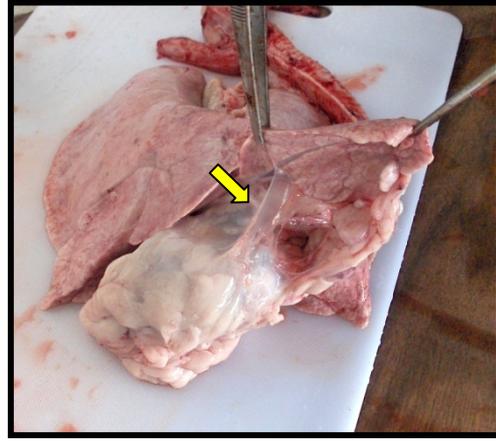


Fig.29. Adherencias entre lóbulos pulmonares y saco pericárdico con engrosamiento del mismo.

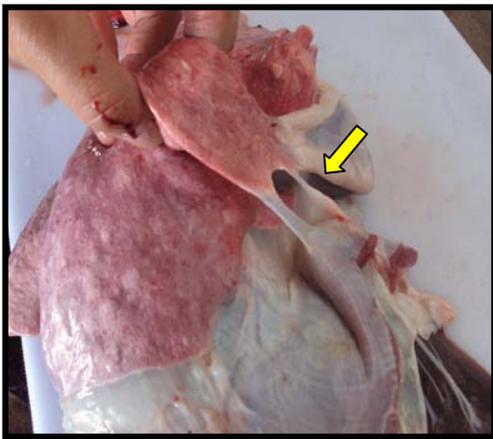


Fig.30. Adherencias entre lóbulos pulmonares y diafragma.

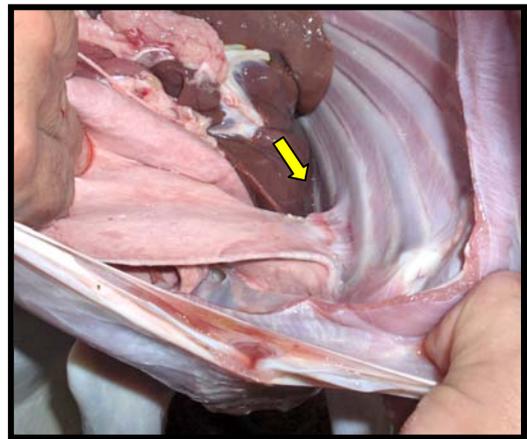


Fig.31. Adherencias entre lóbulos pulmonares y pared de la cavidad torácica.

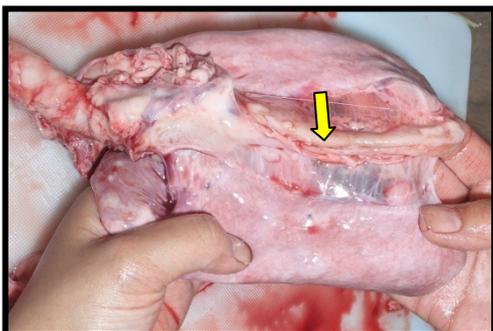


Fig.32. Hiperplasia de nódulo linfoide mediastínico.

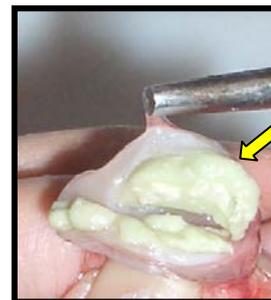


Fig.33. Exudado purulento en parénquima de nódulo traqueobronquial.

Cuadro 3. Distribución y severidad de las lesiones encontradas en la evaluación a la necropsia de los diferentes grupos evaluados.

	Neumonía intersticial craneoventral	Hemorragias petequiales y congestión vascular.	Adherencias Interpulmonares, a corazón y / o a tórax	Hiperplasia de Nódulos linfoides	Consolidación pulmonar	Neumonía Lobar aguda craneoventral	Neumonía Fibrinopurulenta aguda craneoventral
Grupo A	+++ 8:8 100%	++ 5:8 62.5 %	+ 3:8 37.5 %	+++ 8:8 100%	-	-	-
Grupo B	+ 3:8 37.5%	+ 3:8 37.5%	+++ 6:8 75%	+++ 8:8 100%	+++ 2:8 25%	+++ 2:8 25%	+++ 2:8 25%
Grupo C	++ 3:8 37.5%	++ 3:8 37.5%	+++ 3:8 37.5%	+++ 8:8 100%	++ 4:8 50%	+++ 4:8 50%	-
Grupo D	+++ 8:8 100%	++ 5:8 62.5 %	+ 4:8 50 %	+++ 8:8 100%	-	-	-
Grupo E	++ 2:8 25%	+++ 5:8 62.5%	+++ 4:8 50%	+++ 8:8 100%	+++ 7:8 87.5 %	+++ 5:8 62.5%	+++ 2:8 25%

+ discreta
++ moderada
+++ severa

Grupo A: Animales vacunados con la vacuna comercial / I.M.

Grupo B: Animales vacunados con MVs / I.N.

Grupo C: Animales control.

Grupo D: Animales vacunados con MVs / I.M.

Grupo E: Animales vacunados con PME / I.M.

I.M: Intramuscular

I.N: Intranasal

PME: Proteínas de membrana externa

MVs: microvesículas

VII.8.2. Histopatología.

Los hallazgos histopatológicos observados revelaron que la lesión que prevaleció en el parénquima pulmonar fue la neumonía intersticial (**Figura 34**), la cual se caracterizó microscópicamente con objetivo de 4X, por el engrosamiento del epitelio alveolar y los septos interalveolares (**Figura 35**). Dicho engrosamiento se debía a la presencia de un infiltrado inflamatorio mononuclear (M.N). Otro hallazgo evidente a la revisión con este objetivo, fue el engrosamiento de la pleura (**Figura 36**), por modificación de tejido conectivo, colágeno laxo (T.C.C.L). Con objetivo de 40X, se observó que la luz de los alveolos se encontraba reducida de tamaño por el mismo engrosamiento del epitelio y en algunos casos, éste era ocupado por células inflamatorias.

Uno de los hallazgos más importantes y que prevaleció en un 95% de los casos fue la hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquiolos (BALT), que con objetivo de 4X, se observó que se encontraba muy hiperplásica desarrollarse hasta el grado de generar continuidad hacia la lesión intersticial en la red alveolar, generando un aspecto difuso (**Figura 37**). El infiltrado intersticial podía llegar a obstruir la luz de alveolos y reducir en la mayoría de los casos la luz bronquiolar. Con objetivo de 100X, se revisó detalladamente el epitelio de bronquios y bronquiolos, encontrando múltiples cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (I.C) eosinofílicos, posiblemente asociados al virus (PI3) que se utilizó para el desafío viral (**Figura 38**).

Sobre estas lesiones se podía apreciar claramente con objetivo de 10X, que múltiples bronquios y bronquiolos (**Figura 39**) se encontraban obstruidos por un material eosinofílico de aspecto fibrilar que se interpretó como fibrina, asociado a un infiltrado celular inflamatorio polimorfonuclear (PMN) (**Figura 40**). Con objetivo de 40X, se observaron con mayor detalle las características nucleares de este tipo de exudado (**Figuras 41, 42 y 43**). En otros casos se pudo apreciar el engrosamiento de los septos interalveolares por la deposición de fibrina en dichas estructuras, caracterizando este tipo de lesiones a la neumonía producida por *M. haemolytica*. Los cambios vasculares como hemorragia y congestión se encontraban delimitando este tipo de lesiones.

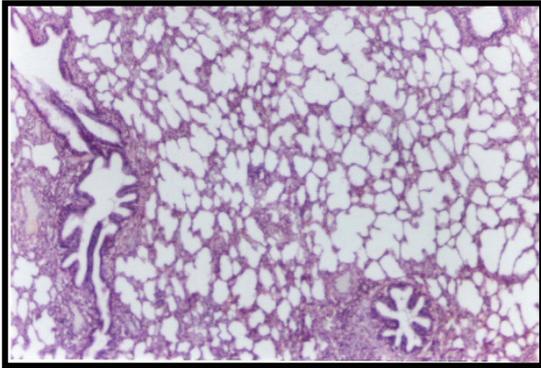


Fig. 34. Objetivo 4X, neumonía intersticial.

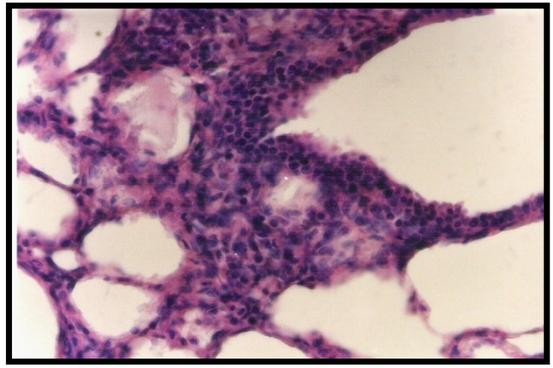


Fig.35. Objetivo 40X, engrosamiento de pared alveolar por infiltrado mononuclear.

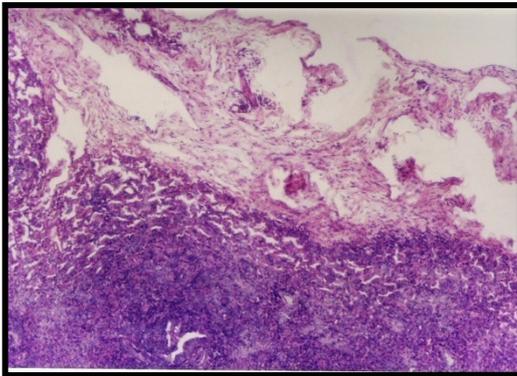


Fig. 36. Objetivo 4X, engrosamiento de pleura por hiperplasia de tejido conectivo colágeno laxo.

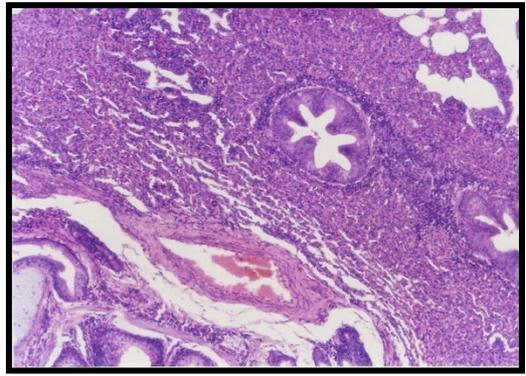


Fig. 37. Objetivo 4X, hiperplasia de tejido linfoide asociado a bronquiolos.

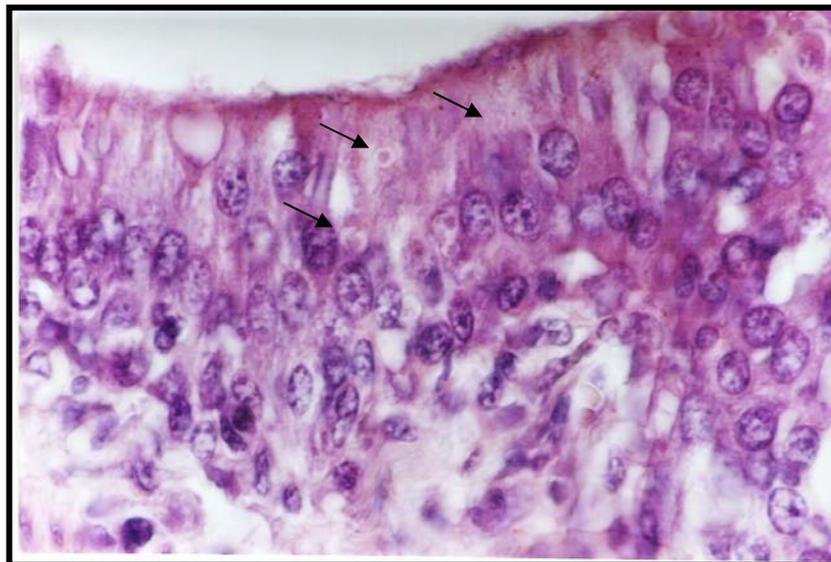


Fig. 38. Objetivo 100X, múltiples cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos en el epitelio de un bronquio.

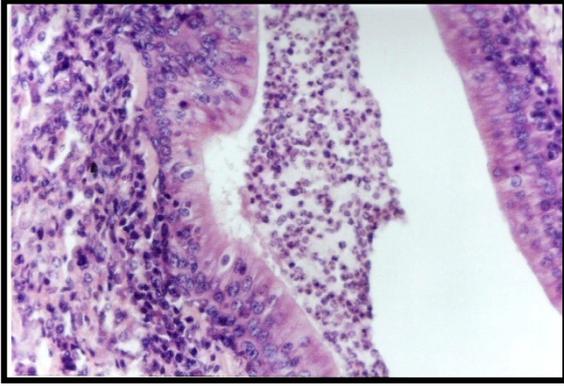


Fig. 39. Objetivo 10X, infiltrado polimorfonuclear en la luz de un bronquiolo.

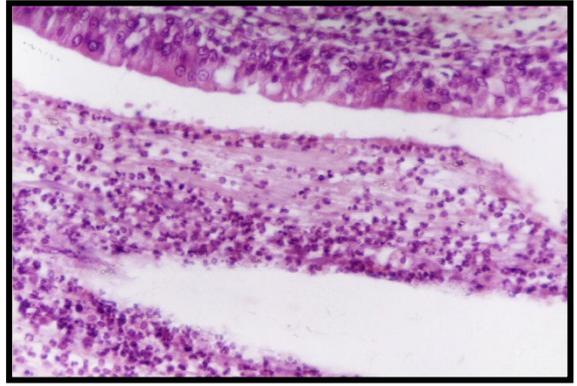


Fig. 40. Objetivo 10X, bronquitis fibrinosupurativa.

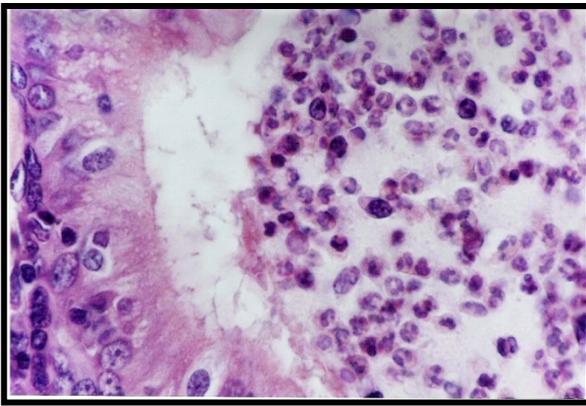


Fig. 41. Objetivo 40X, infiltrado mixto de polimorfonucleares, mononucleares y fibrina.

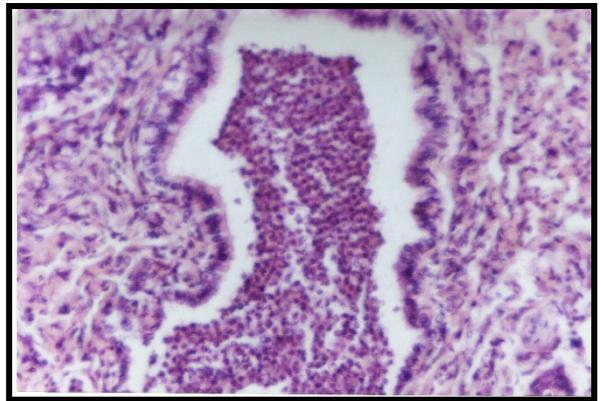


Fig. 42. Objetivo 20X, bronquitis supurativa coexistiendo con una neumonía intersticial.

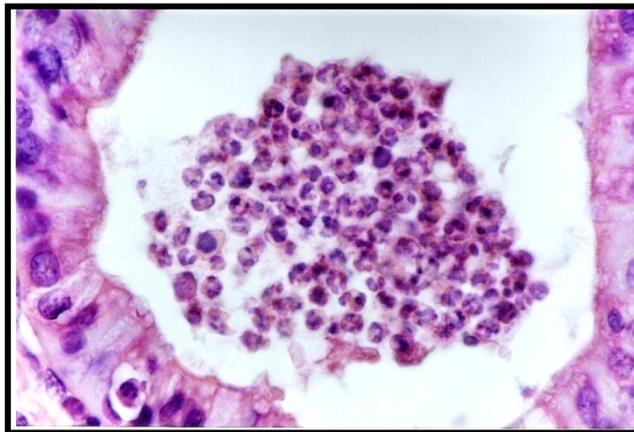


Fig. 43. Objetivo 40X, bronquitis supurativa.

VIII. DISCUSIÓN

La secreción de los factores de virulencia de los patógenos Gram negativos es complicada, por el hecho de que la envoltura bacteriana consiste en dos bicapas de lípidos, una ligera capa de peptidoglicano, membrana interna, membrana externa y periplasma entre ellos. Los patógenos Gram negativos han desarrollado muchas estrategias, algunas específicas de cada patógeno, capaces de permitir la activación de los diversos factores de virulencia los cuales ganan acceso al espacio extracelular, principalmente en tejidos o en la corriente sanguínea del hospedador ⁸⁰.

La secreción extracelular de sus productos, es el principal mecanismo mediante el cual los patógenos Gram negativos se comunican e intoxican al hospedador. La liberación de vesículas de la envoltura durante el crecimiento de la bacteria sirve como vehículo para secretar proteínas, lípidos y DNA. La producción de éstas ocurre en el tejido infectado y está influenciado, por factores del medio ambiente. El papel principal que juegan las vesículas es establecerse y colonizar en nichos, acarreado y transmitiendo factores de virulencia a los tejidos del huésped, así como también modulando las respuestas de defensa del hospedador. La liberación de toxinas mediada por vesículas es un potente mecanismo de defensa exhibido por diversos patógenos Gram negativos. Las propiedades bioquímicas y funcionales de las vesículas que liberan los patógenos al medio, revelan su potencial de impacto en las enfermedades que producen. Estudios con microvesículas de diversos orígenes bacterianos soportan una función en común: Las vesículas son el medio por el cual la bacteria interactúa con las otras células procariontas, eucariotas y con su medio ambiente ¹⁴¹.

En *M. haemolytica* serotipo A1 (National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa 50010) y serotipo A2 (cepa virulenta de campo), se identificaron microvesículas, liberadas durante su crecimiento normal *in vitro* en medio BHI líquido, así como también se exacerbó la producción y liberación de las mismas, en medio adicionado con gentamicina (20µl/ml de medio de cultivo). Este documento es el primer reporte de dichas estructuras (MVs) en este género bacteriano.

El análisis bioquímico y la caracterización funcional de las vesículas de membrana externa derivadas de patógenos, demuestra que este patrón de secreción ha sido utilizado para el transporte de factores de virulencia activos en el huésped. Las vesículas contienen adhesinas, toxinas y componentes inmunomoduladores que actúan directamente mediando la adhesión bacteriana y la invasión, causando citotoxicidad y modulando la respuesta inmune del hospedador. Por la participación que tienen las vesículas en tan diversos aspectos entre la interacción hospedador-patógeno, las microvesículas son considerados potentes factores de virulencia bacteriana ¹⁴¹.

Las especies de *Mannheimia* expresan potentes antígenos de superficie que incluyen al lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PMH), fimbrias y polisacáridos capsulares. Estas bacterias secretan una citolisina específica para leucocitos denominada leucotoxina (LKT), que mata fagocitos. La expresión de los diferentes antígenos ocurre en distintas condiciones de crecimiento. Esto aumenta la posibilidad de que la expresión de antígenos pueda estar alterada *in vivo* y contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Cada uno de estos antígenos contribuye a la enfermedad clínica, en combinación con las secreciones y componentes celulares que favorecen la presentación característica de la enfermedad ¹⁴².

La caracterización de las MVs de *M. haemolytica*, permitió identificar los principales antígenos de la bacteria, considerados así por el papel que juegan en la patogénesis de la enfermedad, tal es el caso de la leucotoxina (LKT), lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME) y un fragmento de DNA. La caracterización de estos antígenos, solo consistió en la identificación de los mismos dentro de la MVs. Sin embargo, desconocemos si algunos de ellos se encuentran biológicamente activos. Tal es el caso de la LKT, la cual fue identificada mediante Western Blot por reacción cruzada positiva con un suero policlonal hecho en conejos de la hemolisina de *A. pleuropneumoniae* 1. La proteína identificada sobre el inmunoblott correspondió a la LKT de *M. haemolytica* con un peso de 104 kDa, muy similar a la hemolisina de *A. pleuropneumoniae* 1, la cual tiene un peso de 105 kDa.

Se sabe que la LKT, es secretada cuando la bacteria se encuentra en su fase de crecimiento logarítmico y actúa como una citolisina formadora de poros insertándose en la membrana de sus células blanco ¹⁴³, resultando esto en un imbalance osmótico

que genera muerte a la célula huésped. La LKT inicia una cascada de eventos que permiten el daño al tejido, neumonía y muerte en los animales ¹⁴⁴.

Los genes que se expresan para la síntesis de la LKT se encuentran concentrados en un operón. Este operón cromosómico *lktCABD*, consta de cuatro genes que codifican para diferentes proteínas. El gen *lktA* (20 kDa) representa el precursor inactivo de la proteína tóxica con la actividad de la leucotoxina madura, la *lktC* codifica para una proteína citoplasmática de 102 kDa, la cual es requerida para la activación postranslacional de la *lktA* a la forma activa de la leucotoxina. Las proteínas que codifican el gen *lktB* (80 kDa) y el gen *lktD* (55 kDa) son esenciales para la secreción extracelular de la leucotoxina ¹⁴⁵.

El hecho de encontrar una banda de 104 kDa sobre el inmunoblot, nos permite establecer, que la LKT, esta siendo ensamblada y secretada completa de la misma manera que lo hace a nivel de membrana citoplasmática durante la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria, de otra manera no se habría identificado la banda con el peso correspondiente a la LKT completa. Es muy probable, que ésta se encuentre con actividad citotóxica, sin embargo, estos ensayos no se realizaron en este trabajo.

Kato y col. en el 2002, demostraron que *A. actinomycetemcomitans* transporta en sus MVs, una proteína de 28 kDa homóloga a una lipoproteína principal de membrana externa de *M. haemolytica* y a su LKT. La incubación de MVs de ésta bacteria con células HL60 resultó en un importante porcentaje de lisis. Lo cual indica que las MVs de este género bacteriano, se encuentran asociadas a una leucotoxina biológicamente activa ¹¹³.

Mediante electroforesis, inmunoblot y tinción de plata para proteínas, se observó, que las proteínas que conforman la fracción de membrana externa, se comparten en las MVs, lo cual es explicable dada la génesis de la mismas. Además, se identificaron mediante software (GeneTools from SynGene, England; Cambridge) una serie de proteínas en las MVs que van desde rangos de los 270 kDa hasta de aproximadamente 6 kDa. Muchas de estas proteínas pudieran corresponder a las proteínas del periplasma o bien a aquellas que se encuentran en constante flujo y recambio entre la membrana interna y la externa. De tal manera, que al momento en el que se forma la MVs, se arrastran dichos componentes al interior de la misma. De las proteínas de membrana

externa de *M. haemolytica*, solo se conoce la función de aquellas que ya han sido reportadas en la literatura (porinas, lipoproteínas, proteínas de transporte y adhesinas), del resto de ellas, así como de las muchas otras más que arrastra la MVs durante su formación, se desconoce su función y efecto. Dado que las MVs se forman a partir de la membrana externa, entonces acarrean en su estructura una gran cantidad de PME que las enriquecen antigénicamente.

Pandher y col. en 1998, reportó una proteína de membrana externa de 45-kDa la cual demostró tener una alta respuesta de anticuerpos al correlacionarla con la resistencia al desafío experimental. Pandher reportó la clonación, secuenciación y caracterización del gen que codifica para la proteína de ME de 45 kDa de *M. haemolytica* A1, designada como PlpE, la cual se encontró que es genéticamente similar a una lipoproteína (OmlA) inmunogénica de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1 y 5. La purificación mediante inmunoafinidad con anticuerpos anti-PlpE, reconocieron una PME de tamaño similar en todos los serotipos de *M. haemolytica* excepto en el serotipo 11, el cual posteriormente fue reclasificado en *Mannheimia glucosida*. La lipoproteína (PlpE) se encuentra expuesta en la superficie de la bacteria y es altamente inmunogénica para el ganado. En ensayos de complemento hubo una reducción significativa en la muerte de *M. haemolytica* cuando el sistema se saturó de suero hiperinmune de bovino anti- PlpE ⁷².

Por otro lado, en un trabajo hecho por González y col. en el 2002, en donde se evaluó la respuesta inmune de borregos mediante Western Blot tanto de animales muestreados en campo como de animales desafiados experimentalmente a las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* A2, se observó que un alto porcentaje de los sueros de estos animales, reconocían fuertemente sobre las membranas de nitrocelulosa varias proteínas, pero principalmente dos, una de 45 kDa y otra de 54 kDa ⁷⁶.

En el análisis de imágenes mediante software de las electroforesis que se tiñeron con plata y Comassie a partir de PME y de MVs, se identificaron las proteínas de 54 y 45 kDa. Desconocemos la función de éstas dos proteínas en el serotipo A2. Sin embargo, no se descarta su elevada antigenicidad ante el sistema inmune de los borregos. Sin descartar la posibilidad que de que la proteína de 45 kDa, sea efectivamente el de una lipoproteína (PlpE).

Existen estudios que indican que los anticuerpos contra las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* juegan un papel muy importante en la inmunidad contra la Mannheimiosis Neumónica (Pasteurelosis Neumónica) del ganado, ya que son de los antígenos más importantes en la estimulación a la resistencia a dicha enfermedad. Estudios hechos por Morton y colaboradores, en 1990, 1994 y 1995, por Moiser y colaboradores, en 1989, y por Confer en 1993., indican una correlación estadísticamente significativa, entre la resistencia a la pasteurelosis neumónica y la presencia de anticuerpos séricos, dirigidos contra una gran cantidad de proteínas presentes en extractos salinos de toda la célula bacteriana ⁷⁵.

Es importante mencionar también que de *M. haemolytica* A1, se ha identificado como adhesina, una proteína de la fracción de membrana externa de 68 kDa ¹⁴⁶. En este trabajo se probó sobre las inmunotransferencias tanto de MVs como de PME, un suero policlonal hecho en conejos anti-adhesina a colágena tipo III de 60 kDa de *A. pleuropneumoniae*, el cual tuvo una reacción cruzada positiva sobre los inmunoblots. Lo cual indica, que *M. haemolytica*, porta una proteína homóloga de peso y estructura antigénica similar a la reportada en *A. pleuropneumoniae*. En este trabajo solo se identificó a la proteína en MVs de *M. haemolytica*, pero se desconoce su función en este género bacteriano.

Sin embargo, Lo. y col. 1996., a partir de clones de *E. coli* tratadas con plásmidos recombinantes que expresan antígenos de *M. haemolytica* A1, aislaron una proteína de 60 kDa, que probó tener una alta inmunogenicidad dada la respuesta de anticuerpos la cual fue significativamente correlacionada con la resistencia a la enfermedad basado en datos con un fragmento clonado parcialmente. Se encontró que el gen que codifica para la proteína de 60 kDa esta presente solo en biotipos A y no en los biotipos T. Dicha proteína demostró un alto reconocimiento antigénico mediante Western Blot, al probarlo con suero de ganado vacunado con "Presponse" que fue resistente al desafío experimental ¹⁴⁷.

Por otro lado, se identificó mediante tinción de plata, el LPS tanto en la fracción de membrana externa de *M. haemolytica* A2 como de sus MVs. Esta estructura se encuentra conformacionalmente anclada sobre la membrana externa, haciendo posible de esta manera, que durante la génesis de la MVs, se arrastre este antígeno

estructural de la ME del patógeno a la MVs. La presencia positiva del LPS en dichas estructuras hace aún más atractivo, el efecto antigénico.

El LPS del género *Mannheimia* comprende del 10 al 25% del peso seco de la bacteria. Este antígeno generalmente se encuentra asociado a la célula bacteriana, pero ha podido detectarse libre en infecciones pulmonares¹⁴⁸. Se le considera uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad de inducir una respuesta inflamatoria¹⁴⁹. Se sabe que tanto la LKT como el LPS inducen la expresión de genes para citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 y TNF- α en los macrófagos alveolares del bovino^{150, 151}.

Las MVs contienen componentes que son reconocidos por células eucariotas en los patrones de respuesta inmune innata y adquirida. Considerando las propiedades de la ME y de los cambios que sufre durante la infección bacteriana (como el antígeno - O del LPS), el impacto de las vesículas en la modulación del sistema inmune podría variar durante el curso de la infección. Ratones infectados con *S. typhimurium* generan una respuesta de células T CD4⁺ que reconocen antígenos en MVs de *Salmonella*¹⁵². El LPS, Las lipoproteínas y las PME presentes en las MVs, son moléculas biológicamente activas que pueden activar al sistema inmune vía receptores Toll-like (TLRs) e inducir migración leucocitaria^{153, 154}.

Tanto la LKT como el LPS de *Mannheimia haemolytica* juegan un papel importante en la patogénesis de la Mannheimiosis Neumónica (Pasteurelosis Neumónica). Se piensa que estos dos antígenos son los principales factores de virulencia de la bacteria durante su invasión, los cuales contribuyen a desarrollar la patología característica de esta enfermedad.

Numerosos trabajos se han realizado en torno a la vacunación con MVs en diversos géneros bacterianos. Una vez establecidos los antígenos que éstas acarrean, se han convertido en importantes biológicos con alto valor inmunológico para prevenir enfermedades inmunizando ratones, cuyos, conejos y humanos.

Las MVs podrían ser capaces de escapar al sistema inmune durante la colonización bacteriana. Se ha propuesto que las vesículas de *Neisseria* actúan como

decodificadores del sistema inmune adhiriendo y removiendo de las células blanco, los factores bactericidas del suero ¹⁵⁵.

Por otro lado, se sabe que la administración parenteral de altas concentraciones de proteínas purificadas, péptidos o conjugados acarreadores de haptenos, permite una elevada respuesta inmune y éstos, al administrarse con un adyuvante, inducen una respuesta mucho mayor tanto humoral como celular en el individuo. La actividad adyuvante del DNA y de los oligodesoxinucleótidos (ODN) fue descrita a principios de 1960. Hechtel y col. ¹⁵⁶ mostraron que la inyección de DNA de timo bovino con DNasa digerida y DNA con células rojas de borrego (SRBC) en ratones, AKR permitió de dos a tres veces más la formación de placas de células, respuesta que se comparó con la administración del antígeno solo.

Diferentes investigaciones han probado que los ODN pueden estimular las células T. Katz y Hamaoka en 1973 ¹⁵⁷, mostraron que los ODN pueden inducir la expansión de acarreadores de superficie de las células T y Allison en 1973 ¹⁵⁸ demostró que éstos son capaces de elevar las reacciones de linfocitos mixtos.

Mannheimia haemolytica acarrea un fragmento de DNA en sus MVs, lo cual podría potencializa el efecto antigénico e inmunológico de las mismas. Hasta el momento se desconoce la función específica de este DNA identificado en MVs. Sin embargo, es cierto que al acompañar a los antígenos acarreados en la MVs, podría generar una mejor respuesta inmune humoral en aquellos individuos que se expongan a las mismas. Las MVs además portan su adyuvante natural (endotoxina) y antígenos bacterianos localizados en la superficie, que las hace altamente inmunogénicas.

El DNA bacteriano esta dotado de propiedades estimuladoras policlonales. Messina y col. en 1991 ¹⁵⁹ y Sun y col. en 1997 ¹⁶⁰ mostraron que el DNA bacteriano induce la proliferación independiente de células T y la síntesis policlonal de inmunoglobulinas en linfocitos B de ratón. Este efecto fue observado con ss-, ds-DNA y con fragmentos de DNA de 100 pb. El efecto del DNA es muy parecido al de las endotoxinas, por lo que se propuso que ambas sustancias estimulan la inmunidad innata accionando directamente la reacción inflamatoria. El DNA plasmídico acciona la maduración de células dendríticas (DCs); Estos autores demostraron que el DNA bacteriano, o CpG ODN, producía la maduración de las DCs inmaduras activándolas y

produciendo citocinas tales como IL-12, IL-6 y FNT α . La inducción y maduración de las DCs y la producción de citocinas muestra que el DNA bacteriano o CpG ODN son capaces de contribuir a la eficiencia de las DCs para iniciar la respuesta inmune celular mediada por células T. Los plásmidos bacterianos inducen además la expresión de genes de IL-1 β y PAF-2, fenómeno característico de la activación de los macrófagos ¹⁶¹.

Numerosos estudios respaldan la capacidad inmunogénica de las MVs evaluadas, principalmente mediante la técnica de ELISA. Rosenqvist y col. demostraron que con la tercera dosis de vacunación de MVs, la mayoría de los individuos que la recibieron, desarrollaron anticuerpos bactericidas (IgG), evaluados mediante ELISA. Los trabajos con la vacunación de biológicos que contienen numerosos antígenos generan una extensa heterogenicidad en la respuesta inmune de humanos ¹⁶².

En el presente trabajo se realizó una evaluación inmunológica mediante la técnica de ELISA indirecta con los sueros de los corderos inmunizados y desafiados experimentalmente. Se estableció un título basal, dadas las características fisiopatológicas de la bacteria, a partir del cual, se comparó la respuesta de los diferentes muestreos según los tratamientos administrados a los diferentes grupos de borregos durante el desarrollo de la evaluación *in vivo*.

Los títulos basales tanto de IgG como de IgM., considerándolos así, dado que los borregos no son animales libres de *Mannheimia haemolytica*, por el contrario portan cepas comensales en vías respiratorias superiores ¹⁶³, que bajo circunstancias de inmunosupresión, pueden multiplicarse y migrar al pulmón causando la enfermedad proliferando rápidamente en este lugar ^{164,165}. En la primera semana de aclimatación, al rebaño se le realizaron exclusivamente, sangrados cada tercer día y se les separó aleatoriamente en cinco grupos de acuerdo a las especificaciones del calendario de inmunización y desafío (**Cuadro 1, 2 y Esquema 3**).

Dicho período permitió que los animales se adaptaran a las nuevas condiciones tanto del macro como del micro ambiente. El comportamiento de los títulos tanto de IgG como de IgM, fue muy parecido, en ambos, los títulos se comportaron de manera muy similar y en todos los grupos, las medias no fueron significativamente diferentes (**P>0.05**). Cabe mencionar, que es en este período, cuando los animales se sometieron a estrés importante durante el transporte de su lugar de procedencia hasta

las instalaciones del CENID-Microbiología. Procesos como este favorecen la reactivación de cepas comensales en vías respiratorias superiores ¹⁶³, generando así, altos títulos de estas inmunoglobulinas (IgG e IgM). Es a partir de estos títulos entonces que se realizaron las evaluaciones de las diferentes inmunizaciones y desafíos, tomándolos desde este momento como títulos basales.

Para el cuarto muestreo, que correspondió a la segunda semana de aclimatación, los animales elevaron sus niveles de IgG, por arriba de las IgM y de los basales. Sin embargo, las medias entre los títulos basales con respecto a los títulos del cuarto muestreo tanto de IgG como de IgM no fueron significativamente diferentes (**P>0.05**).

Entre el 4^o y 5^o la respuesta de IgM se elevó abruptamente, el estado inicial de inmunosupresión al que se les sometió a los animales a su arribo a las instalaciones y posteriormente los cambios de alimentación y los sangrados cada tercer día pudieran haber generado reactivación de cepas comensales de *M. haemolytica* en vías respiratorias superiores, favoreciendo este proceso dadas las circunstancias en las que se encontraban los animales, exacerbando la respuesta de ésta inmunoglobulina durante este periodo. Es evidente que la elevación de las IgM no se debió a la inmunización. Sin embargo la respuesta de las IgG fue aumentando paulatinamente con respecto a los diferentes tratamientos aplicados a los diferentes grupos.

En un estudio realizado por Moiser y col. en 1989, en donde se evaluó la respuesta de IgG e IgM de ganado vacunado con de 3 inmunógenos diferentes: 1) células completas muertas de *M. haemolytica* + adyuvante incompleto de Freund's (FIA), 2) células completas muertas de *M. haemolytica* + hidróxido de Al (ALH) y 3) células completas vivas de *M. haemolytica* (VIVA), a diferentes antígenos (células completas de *M. haemolytica* (WB), subunidades de proteínas y carbohidratos capsulares (CPS), carbohidratos capsulares (CC) y leucotoxina (LKT). La resistencia a la enfermedad se determinó por la inducción experimental de lesiones al desafiar intratorácicamente a los animales. Por lo que se observó, que el grupo de animales vacunados con FIA, así como los animales vacunados con WB, desarrollaron los títulos más altos de IgG con respecto a los demás grupos contra CPS y LKT respectivamente. La elevada respuesta de las IgG a todos los antígenos a probar fue significativamente asociadas con la resistencia a la enfermedad experimental. La respuesta de las IgM solo se correlacionó significativamente con la resistencia en la respuesta a los CPS.

Estos estudios indican que las IgG séricas responden a varios antígenos de superficie de la bacteria, así como a la LKT, la cual puede aumentar la resistencia a la enfermedad experimental. Mientras que la respuesta de las IgM aparentemente no juegan un papel importante en la resistencia en la enfermedad experimental ¹⁶⁶.

Es hasta el quinto y séptimo muestreo, cuando se realizó la primera y segunda inmunización respectivamente con los diferentes antígenos de *Mannheimia haemolytica* A2, incluyendo una vacuna comercial, por diferentes vías (**Cuadro 1**) y a partir de este momento también, se hace evidente la respuesta de las IgM sobre las IgG elevándose ambas por arriba del muestreo basal. Las medias del quinto muestreo entre las IgG e IgM, de los diferentes grupos fueron significativamente diferentes (**p<0.05**) excepto en el grupo A. De la misma manera el 5º muestreo fue significativamente diferente (**P<0.05**) con respecto al muestreo basal. La respuesta inmune primaria por considerarla así dentro del experimento, esta dada por las IgM circulantes. Son estas inmunoglobulinas, las que dan soporte a la respuesta generada por los antígenos inoculados por primera vez o bien en el caso de *Mannheimia*, por los antígenos de "superficie" ¹⁶⁶ inducidos por la bacteria cuando se encuentra como comensal de vías respiratorias altas. Por lo que su elevada respuesta pudiera explicarse a que la prueba de ELISA se realizó con células completas de la bacteria. En este trabajo no se evaluó la respuesta inmune por separado de los antígenos determinados en las MVs (LKT, PME, LPS).

Para el resto de los muestreos, los niveles de IgG y de IgM, con respecto a los basales, permanecieron muy por arriba de los mismos, generando medias significativamente diferentes (**P<0.05**) en todos los casos. Estos niveles reflejan, la respuesta que se fue generando con las inmunizaciones con MVs y posteriormente con los respectivos desafíos, tomando en cuenta que ya existe respuesta previa a la bacteria y que a los animales se les estresó con los sangrados cada tercer día y se continuó inmunosuprimiendo hasta el final del experimento con dexametasona.

Es importante señalar que aún cuando no se observaron diferencias significativas estadísticamente entre los grupos A y D en la prueba de ELISA, la evaluación macroscópica de los pulmones de los animales del grupo A (inmunizados con vacuna comercial vía I.M) con respecto a los del grupo D (inmunizados con MVs vía I.M), fueron muy similares, es decir no desarrollaron lesiones sugestivas a Mannheimiosis Neumónica (Pasteurelosis Neumónica), por el contrario desarrollaron únicamente

neumonías de tipo intersticial, asociadas al agente viral. Lo cual nos sugiere que ambas inmunizaciones se comportaron de manera similar con respecto al desarrollo de las lesiones, a diferencia del resto de los grupos, que desarrollaron neumonías lobares en diferentes grados y distribuciones, asociadas principalmente a la presencia de *Mannheimia*.

El hecho de que los animales de estos grupos (A y D) no hayan desarrollado lesiones neumónicas características de la enfermedad, permite establecer que hubo cierto grado de protección contra el desafío con la cepa virulenta de campo (*M. haemolytica* A2). No así, para el resto de los grupos (B, C y E) quienes desarrollaron lesiones características a la Mennheimiosis Neumónica (Pasteurelosis Neumónica). Se sabe que los animales que desarrollan neumonías, son animales que retrasan su metabolismo, generando una mala conversión alimenticia y bajan de peso, resultando esto en pérdidas económicas importantes a los productores ²³.

El grupo E, que fue el grupo inmunizado con PME por vía I.M, desarrollaron altos títulos tanto de IgG, como de IgM. Sin embargo, esto no se tradujo en protección contra el desarrollo de lesiones, ya que los animales de este grupo (87.5%) desarrollaron neumonías lobares con importantes zonas de consolidación craneoventral, sin que esto afectara los títulos de IgG e IgM que desarrollaron éstos animales, los cuales fueron significativamente diferentes (**P<0.05**) con respecto a los basales.

Numerosos estudios enfatizan la importancia de las PME de *Mannheimia haemolytica*, en relación a la elevada respuesta inmune que generan, en individuos inmunizados con dichas proteínas. Pandher y col. ⁷² identificaron 21 PME altamente inmunogénicas expuestas en la superficie de *Mannheimia haemolytica* A1 mediante el tratamiento con proteasas y Western Blotting. Por otro lado, observaron una elevada respuesta de anticuerpos específicos contra las PME, al correlacionarlos con la resistencia al desafío con una cepa virulenta de *Mannheimia haemolytica* A1 ^{74,79,120}. La vacunación del ganado con fracciones celulares enriquecidas con PME de *Mannheimia haemolytica* A1 también aumentaron significativamente la resistencia al desafío experimental ^{167, 168}.

Las lesiones neumónicas características de la enfermedad, que desarrollaron los animales del grupo E, las pudieron haber generado la reactivación de cepas

comensales, asociada además a la cepa virulenta que se inoculó, exacerbando de esta manera el número de animales enfermos así como la severidad de las lesiones. No podemos perder de vista lo determinante que es en este tipo de experimentos el factor estrés y la forma en que sometemos al sistema inmune al deprimir las defensas con dexametasona. Estos factores juegan un papel determinante en el desarrollo ó no de lesiones y además de la forma en que cada uno de los individuos sometidos a dichas condiciones pudiera haber respondido.

Los altos títulos de anticuerpos observados en el Grupo B (MVs-I.N) y el Grupo E (PME-I.M) no necesariamente resultaron en una buena protección contra la enfermedad. En un trabajo realizado por Sabri y col. en el 2000., en donde se inmunizaron borregos con PME de los serotipo A2, A7 y A9, se observó que los animales con infección cruzada con *M. haemolytica* A9 vacunados con PME de *M. haemolytica* A2 desarrollaron altos títulos de anticuerpos que no resultaron en una buena protección contra el desarrollo de la enfermedad. Al parecer la respuesta es más específica cuando se desafió con la cepa homóloga con la que se vacunó, pero generalmente no hubo protección cruzada contra el serotipo heterólogo ¹⁶⁹. A nivel de campo, se ha observado que los serotipos comensales, no necesariamente son los mismos que causan el desarrollo de la enfermedad, lo cual sugiere que otros serotipos están interactuando libres en el medio ambiente ^{52 y 59}.

En este trabajo, no podemos descartar que la infección viral comprometió demasiado al sistema, dado las características macroscópicas de las lesiones, en donde prevaleció en un 90% de los casos la neumonía intersticial, las adherencias entre lóbulos pulmonares, hacia saco pericárdico y la pared de la cavidad torácica y una vez que se inoculó *M. haemolytica*, sobre las lesiones intersticiales, los animales del grupo B, C y E desarrollaron zonas de consolidación pulmonar craneoventral, neumonías lobares y bronconeumonías, características de pasteurelisis neumónica, sin que esto influyera en los altos títulos de anticuerpos observados en la ELISA, pero si, en el desarrollo de lesiones a nivel pulmonar.

En un estudio en donde también se evaluó la respuesta inmune en ratones vacunados con MVs de *Neisseria meningitidis* por vía intranasal, se observó que son altamente inmunogénicas en dichos individuos, desarrollándose una respuesta importante de anticuerpos sistémicos y de mucosa ¹⁷⁰.

Dos de ocho (25%) de los corderos inmunizados por vía intranasal (Grupo B) desarrollaron lesiones importantes en los pulmones evaluados. La respuesta inmune de las IgG e IgM, fueron significativamente más altos con respecto a las basales (**P<0.05**). Sin embargo, aún cuando la respuesta se elevó, el 25% de los animales de este grupo enfermaron. Cabe destacar, que la inoculación por vía intranasal en otros experimentos hechos con MVs, se utilizaron nebulizadores, asegurando de alguna manera la introducción del antígeno a evaluar a las vías respiratorias superiores. En este caso, la inoculación se llevó a cabo mediante la deposición directa del inóculo a la entrada de los ollares realizando pequeñas escarificaciones sobre la mucosa de la nariz y reclinando la cabeza de los animales hacia arriba para asegurar la entrada de los antígenos, en algunos casos los animales estornudaban tratando de eliminar el inóculo, de tal manera que parte de este era eliminado en el estornudo. Pero lo interesante es que lo poco que entró y bien se quedó en las vías respiratorias superiores fue suficiente para elevar la respuesta de inmunoglobulinas séricas. Dado que no se midió la IgA, suponemos que a este nivel pudo haberse dado una respuesta inmune local importante.

Se sabe que las vacunas administradas directamente en la superficie de la mucosa nasal inducen una respuesta tanto local como sistémica. Una ventaja de la aplicación de biológicos por esta vía, es la habilidad de la mucosa de inducir anticuerpos (IgA) que actúan como barrera a la invasión de microorganismos patógenos a través de las mismas ¹⁷¹.

Para el grupo control, tres de ocho animales (37.5%) desarrollaron lesiones neumónicas características de Pasteurelisis, lo cual era de esperarse, ya que sólo se administró S.S.F por vía I.M y se desafió tanto con PI3, como con la cepa virulenta de campo de *M. haemolytica* A2. Con este experimento se demostró que los animales no inmunizados con ningún tipo de biológico, pueden desarrollar neumonía ante la presencia de la bacteria patógena, con altos títulos tanto de IgG como de IgM, sin poder evitar así el desarrollo de lesiones.

En las vacunaciones se suele recurrir a la administración de varias dosis del inmunógeno. Con ello se logra no sólo una mejor respuesta secundaria por el hecho de aumentar las células B de memoria, sino que se provoca que las células B de memoria se diferencien a plasmáticas secretoras de anticuerpos de alta afinidad ¹⁷². Esto puede explicar la elevada respuesta inmune ante la doble inmunización con MVs de

Mannheimia haemolytica, sin perder de vista que ya existían anticuerpos previos dado la fisiopatología del agente.

Como sistema de secreción bacteriano de factores, las MVs son únicas, ya que son capaces de dispersar extracelularmente proteínas específicas como parte de un complejo proteico y de lípidos que pueden actuar sinérgicamente para activar tóxicos y patrones de respuesta inmune en el hospedador.

IX. CONCLUSIONES

- Se identificaron y caracterizaron en *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 y A2, microvesículas (MVs) de membrana externa. En las MVs se encontraron los principales antígenos de la bacteria: leucotoxina, lipopolisacárido, proteínas de membrana externa y una fracción de DNA.
- Los títulos de IgG y de IgM a partir del quinto muestreo fueron significativamente diferentes con respecto a los títulos basales (**P<0.05**). Demostrando así la capacidad inmunogénica de las MVs para elevar la respuesta inmune humoral.
- El grupo de los animales inmunizados con la vacuna comercial y el de los inmunizados con las MVs, por vía I.M. desarrollaron únicamente Neumonías intersticiales. Lo cual sugiere que las MVs de *M. haemolytica* A2, protegieron contra el desarrollo de lesiones neumónicas características de la enfermedad.
- Los altos títulos de anticuerpos observados en los animales vacunados por vía I.N, así como los vacunados con PME por vía I.M, no necesariamente resultaron en una buena protección contra el desarrollo de lesiones en la enfermedad.
- La mejor vía de inmunización con MVs de *Mannheimia haemolytica* fue la intramuscular, ya que los animales vacunados por esta vía no desarrollaron lesiones características de la enfermedad.
- Las MVs son inmunógenos muy completos que despiertan una respuesta inmune humoral y pueden proteger contra el desarrollo de lesiones a nivel pulmonar, características de la enfermedad a nivel de campo en ovinos.

X. LITERATURA CITADA.

- 1.** Zecchinon, L. Fett, T. and Desmecht, D., 2005. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. Vet. Res. 36: 133-156
- 2.** Ayala, M. A., 1977, Incidencia y prevalencia de neumonías en becerros Holstein Friesian en etapa de lactancia y destete durante un año en un centro de recría. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. México D.F.
- 3.** Murguía, O. L., 1988. Mortalidad en corderos de razas tropicales del nacimiento al destete. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina. México. p.173
- 4.** Velázquez, O.V., Navarrete, A.P. y Vera, C.H.E., 1987. Frecuencia de aislamientos de *Pasteurella haemolytica* y sensibilidad *in vitro* en cepas obtenidas de corderos de 0–90 días de edad en el valle de Toluca. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina. México. p. 180
- 5.** Trigo, J.F. 1995. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos. Memorias del Seminario de Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, N.L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, N.L., México.,18-22
- 6.** Gibbs, H. A., Allan, E, M., Wiseman, A. et al., 1984. Experimental production of bovine pneumonic pasteurellosis. Res. Vet. Sci., 37: 154-166.
- 7.** Merchant, I.A. y Pecker, A.A., 1994. Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Acriba, España, A.A. and Whitt, D.D. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Am. Sc. for Microbiol., Washington, D.C., 348.
- 8.** Weekley, L. B., Veit, H. P., 1995. Potential morphologic and physiologic factors that may predispose the bovine lung to respiratory disease. Compend Contin Educ Prac Vet 17 (7): 974-983.
- 9.** Aley, M.R. y Clarke, J.L., 1977. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. N. Z. Vet. J., 25:20
- 10.** Babiuk, L. A., Lawman, M.J. P., Biol MI, et. al., 1987. Bovine respiratory disease: pathogenesis and testigo by interferon. In: A Seminar in Bovine Immunology, Western States Veterinary Conference. Veterinary Learning Systems, 12-24.
- 11.** Yates, W.D.G. 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis sheeping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can. J. Comp. Med. 46:225-263.

12. Laurance, O. W., Maheswaran, K. S., Douglas, J. W., Trevor, R. A., Mathur, S. K., 1992. *Pasteurella haemolytica* A1 and Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis. J. Vet. Inter. Med., 6: 11-22.
13. Dereck, A. M., Simons, K. R., Confer, A. W., Panciera, R.J. y Clinkenbeard, K. D., 1989. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infect. Immun., 57: 711
14. Frank, G. H. and Wessman, G.E., 1978. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. J. Clin. Microbiol., 7: 142-145.
15. Sutherland, A.D. and Donachie, W., 1986. Cytotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet. Microbiol., 11: 331-336.
16. Biberstein, E.L., 1978. Biotyping and Serotyping of *Pasteurella haemolytica*. En: Bergan, T. y Norris, J., Methods in Microbiology. Acade. Press Inc. N. Y, 10:253
17. Sneath, P.H.A. and M. Stevens. 1990. *Actinobacillus rosii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella limphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov. and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:148-153
18. Sutherland, A. D. and Redmond, J., 1986. Cytotoxin from ovine strain of *Pasteurella haemolytica*: Characterization studies and partial purification. Vet. Microbiol., 11: 33
19. Øystein A., Quirie M., Donachie W., Bisgaard M., 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. Danish Veterinary Laboratory, DK-1790 Copenhagen V. Vet. Microbiol., 65: 283-290.
20. Blanco, V. F. J., Trigo, F. T. F.J., Jaramillo, M. L., Aguilar, R. F., Tapia, P.G. y Suárez, G. F., 1993. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet. Méx. 24: 107-112.
21. Morales, A. J. F., Jaramillo, M. L., Oropeza, V. Z., Tórtora, P.J.L., Trigo, T. F. J. Y Espino, R. G; 1993. Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella hamolytica* en corderos. Vet. Méx. 24: 97-105.
22. Jaramillo - Arango, C. J., Castro, H. R., Güemes, S. F., Martínez, M. J. J., Aguilar, R. F., Jaramillo, M. L., and Trigo, T. F., 2007. Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the north-central of Mexico. J. of Animal and Vet. Advances: 404-409

- 23.** Aguilar, T. C. y Tórtora, P. J., 1989. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F. Memorias del III Congreso Nacional de Producción Ovina. Tlaxcala, Tlaxcala, México. Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos, México, D.F.: 146-149
- 24.** Lea-Master, B. R., Evermann, J. F. And Lehm kuhl, H. D., 1987. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootia of respiratory tract disease in recently weaned lambs. J. Am. Vet. Med., 190: 1545-1547.
- 25.** López, A., Maxie, M.G., Savan, M., Ruhnke, H.L., Thomson, R. G., Barnum, D. A. and Geissinger, H. D., 1982. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with bovine virus diarrhea or *Mycoplasma bovis*. Can. J. Comp. Med., 46: 302-306.
- 26.** Jubb, Kennedy & Palmer's. 1993. Pathology of Domestic Animals. Academic Press, 5th edition. Edited by M. Grant Maxie, DVM, PhD, DipACVP., Vol.2
- 27.** McGavin, D. M., Carlton, W. W., Zachary, F. J., Thomson, G, R., 2001. Thomson's Special Veterinary Pathology. Edited by St. Louis., London, Mosby. 3rd ed.
- 28.** Banks, W. J. Applied Veterinary Histology. Second ed. Baltimore, Williams & Wilkins., 1986.
- 29.** Binkharst, G. J., Hendricks, P.A.J., Ingh, T. S. G., Hajer, R. and Nijkamp, F. P., 1990. The effect of stress on host defense system on lung damage in calves experimentally infected with *Pasteurella haemolytica* type A1. J. Am. Vet. Med. Ass 37: 525-536
- 30.** Ackermann, R. M. And Brogden, A. K., 2000. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Microbes and Infection. 2: 1079-1088
- 31.** Diamond, G., M. Zasloff, H. Eck, M. Brasseur, W. Lee Maloy, and C. Bevins. 1991. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3952–3956
- 32.** Diamond, G., D. E. Jones, and C. L. Bevins. 1993. Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4596–4600.
- 33.** Kopp, E. B., and S. Ghosh. 1995. NF-kappa B and Rel proteins in innate immunity. Adv. Immunol. 58:1–27.

34. Diamond, G., V. Kaiser, J. Rhodes, J. P. Russell, and C. L. Bevins. 2000. Transcriptional regulation of defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect. Immun.* 68:113–119.
35. Stolzenberg, E. D., G. M. Anderson, M. R. Ackermann, R. H. Whitlock, and M. Zasloff. 1997. Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8686–8690.
36. Breider, M. A., S. Kumar, and R. E. Corstvet. 1991. Interaction of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated damage to pulmonary endothelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:337–350.
37. Breider, M. A., R. D. Walker, F. M. Hopkins, T. W. Schultz, and T. L. Bowerstock. 1988. Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves. *Can. J. Vet. Res.* 52: 205–209.
38. Slocombe, R. F., J. Malark, R. Ingersoll, F. J. Derksen, and N. E. Robinson. 1985. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am. J. Vet. Res.* 46:2253–2258.
39. Weiss, D. J., M. C. Bauer, L. O. Whiteley, S. K. Maheswaran, and T. R. Ames. 1991. Changes in blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.* 52:337–344.
40. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines—CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55:97–179.
41. Kunkel, S. L., N. Lukacs, and R. M. Strieter. 1995. Chemokines and their role in human disease. *Agents Actions Suppl.* 46:11–22
42. Kogan, T. P., B. Dupre', H. Bui, K. L. McAbee, J. M. Kassir, I. L. Scott, X. Hu, P. Vanderslice, P. J. Beck, and R. A. Dixon. 1998. Novel synthetic inhibitors of selectin-mediated cell adhesion: synthesis of 1, 6-bis [3- (3-carboxymethylphenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy) phenyl] hexane (TBC1269). *J. Med. Chem.* 41:1099–1111.
43. Kogan, T. P., B. Dupre, and L. L. Scott. 1997. Di- and trivalent small molecule selectin inhibitors. Patent WO9701335.
44. Gentry, M. J., et. al., Serum neutralization of cytotoxin from *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 9: 239-250

45. Weekley, L. B., Tech, V. V., Eyre, P., 1998. Bovine Pneumonic Pasteurellosis. Part I. Pathophysiology, 20, No. 1.
46. Frank, G. H., Briggs, R. E., Loon, R. W., et. Al., 1994. Serotype specific inhibitor of colonization of the tonsils and nasopharynx of calves by *Pasteurella haemolytica* serotype 1 after vaccination with the organism. Am. J. Vet. Res., 8: 1107-1110.
47. Hamdy, A. H., Trapp, A. L., 1967. Investigation of nasal flora of feedlot calves before and after weaning. Am. J. Vet. Res., 28:1019-1025
48. Jones, C. D. R., 1987. Proliferation of *Pasteurella haemolytica* in the calf respiratory tract after and abrupt change in climate. Res. Vet. Sci., 42: 179-186.
49. Pardy, C. W., Scantan, C. M., Loan, R. W., Foster, G. S., 1993. Identification of *Pasteurella haemolytica* A1 isolated from market stressed feeder calves by use of enzyme and antimicrobial susceptibility profiles. Am. J. Vet. Res., 54: 179-186.
50. Briggs, R. E., Frank, G. H., 1992. Increased elastase activity in nasal mucus associated with nasal colonization by *Pasteurella haemolytica* in infectious bovine rhinotracheitis virus-infected calves. Am. J. Vet. Res., 53: 631-635.
51. Jericho, K. W. F., Lejeune, A., Tiffin, G. B., 1986. Bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica* aerobiology in experimentally in infected calves. Am. J. Vet. Res., 47: 205-209.
52. González, R. C., Morales, A. J. F., Tenorio, G. V. R., Cuellar, O. J. A., 1997. Aislamiento y caracterización parcial de *Pasteurella sp.* de cuadros neumónicos en bovinos y ovinos. Tesis de Licenciatura; UNAM, FES- Cuautitlán.
53. Pijoan, A. C., Infecciones mixtas del Aparato Respiratorio; 1978. Ciencia Veterinaria, Vol. 2: 216-228
54. Kumar, V., Abbas, K. A., and Fausto, N., 2006. Robbins & Cotran Patología Estructural y Funcional. McGraw - Hill Interamericana., 7th Edition.
55. Majno, G. and Joris, I., 2004. Cell, Tissues and Disease, Principles of General Pathology. Blackwell Science. Oxford University Press, 2 edition
56. Fillion L.G., et. Al., 1983. Nonspecific suppressive effect of bovine herpesvirus type I on bovine leucocyte functions. Infect. Immun., 42: 106-112.
57. Carrier P.D., et. al, 1983. Exposure of calves to aerosols of parainfluenza - 3 virus and *Pasteurella haemolytica*. Can. J. Comp. Med., 47:422-432.

- 58.**Trigo, T. F. J., El virus respiratorio sincicial bovino en las neumonías de los bovinos y ovinos. *Vet. Mex.*, 14:175-179
- 59.**Morales, A. J. F., 1994. Avances y perspectivas sobre inmunización contra la pasteurelosis neumónica en ovinos. Resúmenes del simposio de inmunología del aparato respiratorio., FESC-UNAM., 19-26.
- 60.** Mork, D.W., Raybould, T. J. G., Acres, S. D., Babiuk, L. A., Nelligan, J., Costerton, J. W., 1987. Electron microscopic description of glycocalyx and fimbriae on the surface of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res*; 51:83-88.
- 61.** Mork, D.W., Watts, T.C., Acres, S.D., 1988Costerton, J.W., 1988. Electron microscopic examination of cells of *Pasteurella haemolytica*-A1 in experimentally infected cattle. *Ca J Vet Res*; 52:343-348.
- 62.** Mork, D.W., Olson, M.E., Acres, S.D., Daoust, P.Y., Costerton, J.W., 1989. Presence of bacterial glycocalyx and fimbriae on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can J Vet Res*; 53:167-171.
- 63.**Kimura, A., Gulig, P. A., McCracken, G. H, Jr., et. al., 1985. A minor high-molecular weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. *Infec. Immun.*, 47: 253-259.
- 64.**Gulig, P. A., McCracken, G. H. Jr, Frish, C. F., at al. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. *Infec. Immun.*, 37: 82-88.
- 65.**Purdy, C. W., Straus, D. C., Struck, D., et al., 1993. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasteurelosis. *An. J. Vet. Res.*, 54:1637-1647.
- 66.**Conton, J. A., Shewen, P. E., Lo, R. Y, C., 1991. Efficacy of recombinant leucotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.*, 59:587-591.
- 67.**Shewen PE, Wilkie BN. 1988. Vaccination of calves whit leucotoxin culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can J Vet Res.*, 52:30-36
- 68.**Squire, P.G., Smiley, D.W., Croskell, R.B., 1984. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect. Immun*; 45: 667-673.
- 69.**Iovane G., Galdiero M., Vietello M., De Martino L., 1998. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins of bovine neutrophils. *FEMS, Immunol Med. Microbiol.*, 1:29-36

- 70.**Donachie, W., 1996. Vaccines against *Pasteurella*. World Association of Microbiologists Immunologists and Specialists in Infection Disease 14th International Symposium, Edinburgh. Annual Scientific Report, 1997.
- 71.**Kyd, J.M., Taylor, D., Cripps AW., 1994. Conservation of immune responses to proteins isolated by preparative polyacrylamide gel electrophoresis from the outer membrane of nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun; 62: 5652-5658.
- 72.**Pandher K, Murphy, G.L., 1996. Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. Vet. Microbiol; 51: 331-334.
- 73.**Morton, R.J., Panciera, R.J., Fulton, R.W., et al., 1995. Vaccination of cattle with outer membrane –protein–enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. Am. J. Vet. Res; 56: 875-879.
- 74.**Confer, A.W., McCraw, R.D., Durham, J.A. et al., 1995. Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. Vet. Immunol Immunopathol; 47: 101-110.
- 75.**Morton, R. J., Confer, A. W., Mosier, D. A. and Simons, K. R., 1994. Outer Membrane Protein antigens of *Pasteurella haemolytica* associate with resistance to pneumonic pasteurellosis. Annu. Meet. Conf. Res. Work. Anim. Dis.
- 76.**González, R. C; Trigo, T. J. F; Tórtora, P. J.L; Morales, A.F.J. 2002. Perfil serológico contra antígenos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en corderos clínicamente enfermos de neumonía y desafiados experimentalmente. Tesis de Maestría; UNAM, FES-Cuautitlán.
- 77.**Confer, A. W, Panciera, R. J., Moiser, D. A., 1988. Bovine pneumonic pasteurellosis: immunity to *Pasteurella haemolytica*. J Am Vet Med Assoc., 193: 1308-1316.
- 78.**Gentry, M.L., Confer, A.W. y Kreps, J.A., 1985. Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. J. Clin. Microbiol; 22:968.
- 79.**Moiser, D.A., Simons, K.R., Confer, A.W., et al. 1987. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infec Immun., 57:711-716
- 80.**Henderson, I. R., Navarro, G. F., Desvaux, M., Fernández, R. C. and Ala´Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: The autotransporter store. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 692-744

- 81.**Koster, M., Bitter, W. and Tommassen, J., 2000. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 290:325-331.
- 82.**Thanassi, D. G. and Hultgren, S. J., 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Op Cell Biol* 12:420-430.
- 83.**Lee, V. T. and Schneewind, O., 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes and Develop* 15:1725-1752.
- 84.**Buchanan, S. K., 2001. Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel tunnel. *Trends Biochem Sci* 26:3-6.
- 85.**Binet, R., L toff , S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P. and Wandersman, C., 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters – a review. *Gene* 192:7-11
- 86.**Sandkvist, M., 2001. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 40:271-283.
- 87.**Mayrand, D. and Grenier, D. 1989. Biological activities of outer membrane vesicles. *Can. J. Microbiol.* 35:607-613.
- 88.**Kadurugamuwa, J. L. and Beveridge, T. J., 1997. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 615-621
- 89.**Li, Z., Clarke, A., and Beveridge, T. J. 1998. Gram- negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.* 180: 5478-5483
- 90.**Beveridge, T. J., 1999. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181:4725-4733.
- 91.**Hoekstra, D., van der Laan, J. W., de Leij, L., and Witholt, B. 1976. Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys. Acta* 455: 889-899.
- 92.**Gankeman, H., Wensink, J., Guinee, P.A., Cansen, W. H., and Witholt, B. 1980. Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 29: 704-713
- 93.**Kadurugamuwa, J. L. and Beveridge, T. J., 1999. Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other Gram-negative bacteria. *Microbiology.* 145: 2051-2060

- 94.** Dutta, S., Iida, K., Takade, A., Meno, Y., Nair, G. B. and Yoshida, S. 2004. Release of shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* Serotype 1 Strains and in vitro effects of antimicrobials on toxins production and release. *Microbiol. Immunol.* 48: 965-969
- 95.** Devoe, I. W. and Gilchrist, J. E. 1973. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.* 138: 1156-1167
- 96.** Dorward, D. W., Garon, C. F., and Judd, R. C. 1989. Export and intracellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 171:2499-2505
- 97.** Grenier, D. and Mayrand, D. 1987. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* 55: 111-117.
- 98.** Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D. E. and Doyle, R. J., 1998. On the origin of the membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 223-228
- 99.** Kadurugamuwa, J. L., and T. J. Beveridge. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal grow and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretions. *J. Bacteriol.* 177:3998-4008.
- 100.** Fiocca, Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T. L., and Solcia, E. 1999. Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J. Pathol.* 188: 220-226
- 101.** Chatterjee, S. N. and Das, J. 1967. Electron microscopic observation on the excretion of cell – wall material by *Vibrio cholera*. *J. Gen. Microbiol.* 49: 1-11.
- 102.** Kondo, K., Takade, A., and Amako, K. 1993. Release of the outer membrane vesicles from *Vibrio cholera parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* 37:149-152
- 103.** Vesey, C. J., Kitchens, R. L., Wolfbauer, G., Albers, J, J., and Munford, R. S. 2000. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from Gram-negative bacterial membranes. *Infect. Immun.* 68: 2410-2417
- 104.** Wai, S. N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y., and Uhlin, B. E. 2003. Vesicles-mediated export and assembly of pore – forming oligomers of the enterobacterial Cya cytotoxin. *Cell* 115:25-35

- 105.** Gamazo, C. and Moriyon, I. 1987. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 55: 609-615
- 106.** Logan, S. M. and Trust, T. J. 1982. Outer membrane characteristics of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 38: 607-613.
- 107.** Blaser, M. J., Hopkins, J. A., Berka, R. M., Vasil, M. L., Wang, W. L., 1983. Identification and characterization of *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 42: 276-284.
- 108.** Nowothy, A., Behling, U. H., Hammond, B., Lai, C. H., Listgarten, M., Pham, P. H., and Sanavi, F. 1982. Release of toxic microvesicles by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 37: 151-154.
- 109.** Khandelwal, P. and Banerjee-Bhatnagar, N. 2003. Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2032-2037
- 110.** Shoberg, R. J., and Thomas, D. D., 1993. Specific adherence of *Borrelia burgdorferi* extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. *Infect. Immun.* 61: 3892-3900.
- 111.** Núñez del Arco, A. L., Salas, T. E., Garza, M., Díaz, A. E., Tenorio, G. V., 2006. Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. *Can J Vet Res.* 70 (1):43-9 16548331
- 112.** Abascal, N. E., García, R. M., Reyes, E. M., Godínez, D., Garza, G. M., 2000. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS, Microbiology.* P. 109-113
- 113.** Kato. S., Kowashi, Y. And Demuth, R. D., 2002. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microbial Pathogenesis.* 32(1):1-13
- 114.** Hozbor, D., Rodríguez, E. M., Fernández, J., Lagares, A., Guiso, N. and Yantorno, O., 1999. Release of Outer Membrane Vesicles from *Bordetella pertusis*. *Current Microbiology.* 38:273-278
- 115.** Moe, G. R., Mitchell – Zuno, P., Hammond, N. S. and Granoff, M. D. 2002. Sequential Immunization with Vesicles Prepared from Heterologous *Neisseria meningitidis* Strain Elicits Broadly Protective Serum Antibodies to Group B Strains. *Infection and Immunity,* Vol. 70, No. 11., p 6021 -6031

- 116.** Gilmour, N. J., W. Donachie, A. D. Sutherland, J. S. Gilmour, G. E. Jones, and M. Quirie. 1991. Vaccine containing iron-regulated proteins of *Pasteurella haemolytica* A2 enhances protection against experimental pasteurellosis in lambs. *Vaccine* 9:137-140.
- 117.** Roger, J. L. 1989. Parainfluenza 3 vaccination of sheep. *Veterinary Record* 125:435-436.
- 118.** Confer, A.W., Panciera, R.J., Corsvet, R.E., Rummage, J.A., and Fulton, R.W., 1984. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Mannheimia haemolytica* used as a live vaccine. *Am. J. Vet. Res.* , 45: 2543.
- 119.** Confer, A.W., Panciera, R.J., Fulton, R.W., Gentry, M.J. and Rummage, J.A., 1985. Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 342.
- 120.** Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. and Fulton, R.W., 1986. Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 47:1853.
- 121.** Confer, A.W., Panciera, R, J., Mosier, D.A., 1985. Immunity to *Pasteurella haemolytica*. *JAVMA* 193:1308-1316
- 122.** Donachie, W. 1994. Vaccine development against *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. Abstract book HAP 94 In Edinburgh, *Haemophilus, Actinobacillus* and *Pasteurella*. International Conference U.K. 31 July- 4 August p. 18-19
- 123.** Ortega, F.D., Tovar, L.G.V, López, G.C., Cuéllar, O.J.A y Morales, A.J.F. Respuesta serológica a cuatro biológicos comerciales y uno experimental para prevenir la Pasteurellosis Neumónica en ovinos. IV Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Curitiba, Brasil. 2005.
- 124.** Téllez, L. I. y Salazar, L. Evaluación de una vacuna comercial y una experimental contra la pasteurellosis neumónica en ovinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 2000.
- 125.** Morales, Á. J. F. Muerte Súbita Asociada A Pasteurellosis Neumónica En Bovinos. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal. INIFAP. México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México
- 126.** Riezu-Boj, J. I., Moriyon, I., Blasco, J. M. Gamazo, C. and Díaz, R., 1986. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. *Infect. Immun.* 58: 489-494

- 127.** Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. *Anal Biochemistry* 72: 248-254.
- 128.** Laemmli, W. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227:680-685
- 129.** Dabo, S. M., Styre, D., Confer, A. W. and Murphy, G. L., 1994. Expression, purification and immunologic analysis of *Pasteurella haemolytica* A1 28-30 kDa lipoproteins. *Microbiol. Pathogen.*, 17:149-158
- 130.** Sambrook, J., Russell, W. D., 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, E.U. Vol. 1, Protocols. Staining SDS-Polyacrylamide Gels with Silver salts (A8.47-A8.49)
- 131.** Sambrook, J., Russell, W. D., 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, E.U. Vol. 1, Protocols. Staining LPS in SDS-Polyacrylamide Gels with Silver salts (A9.5-A9.7)
- 132.** Southwick, S. F., Carr, S. H., Carden III, A. G., D'Alisa, M. R. and Rosenkranz, S. H., 1972. Effects of Acridine Orange on the Growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*: 110(1): 439-441
- 133.** Tomás, M. J. and Kay, W. W., 2005. A simple and rapid method for the elimination of R plasmids from enteric bacteria. *Current Microbiol*. Vol. II. No.3:155-157
- 134.** Sambrook, J., Russell, W. D., 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, E.U. Vol. 1, Protocols. Preparation of Plasmid DNA by Alcalyne Lysis with SDS. (A1.31-A1.84)
- 135.** Toubin, H. and Gordon, J., 1984. Immunoblotting and dot immunoblot. *Current. Status and Out Luck*. *J. Immunol. Method*. 72:313
- 136.** Bancroft, J. D., and Stevens, A., 1990. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3rd edition. Churchill Livingstone Inc. USA.
- 137.** Stevens, A., 1990. *The Hematoxylin. Theory and Practice of Histological Techniques*. 3rd edition. Churchill Livingstone Inc. USA.
- 138.** Burrells, C., Evans, H.B., Dawson, A.M., 1983. Antigenic relationships between the serotypes of *Pasteurella haemolytica* demonstrable by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Res Vet Sci*; 35 (1):80-6.

- 139.** Donachie, W., Burrells, C., Dawson, A. M., 1983. Specificity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in the sera of specific pathogen-free lambs vaccinated with *Pasteurella haemolytica* antigens. *Vet Microbiol*; 8(2):199-205.
- 140.** Enríquez, V. I., Guerrero, L. A., Serrano, J. J., Godínez, D., Rosales, L. J., Tenorio, G.V., De la Garza, M., 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology*,150: 2391-2400
- 141.** Kuehn, J. M. and Kesty, C. N. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development*. 19:2645-2655.
- 142.** Whiteley, O. L., Meheswaran, K. S., Weiss, J. D., Ames, R. T. and Kannan, S. M., 1992. *Pasteurella haemolytica* A1 and Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis. *J. Vet. I. Med.*; 6: 11-22
- 143.** Clinkenbeard, K. D., Moiser, D. A. and Confer, A. W., 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Immun*. 57: 420-425
- 144.** Sreevatsan, S. J. S. and Maheswaran, S. K., 2002. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Animal Health Research Reviews*, Vol. 3, No. 2, pp. 69-82
- 145.** Davies, R. L., S. Campbell, and T. S. Whittam. 2002. Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (lktCABD) in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Pasteurella trehalosi*. *J. Bacteriol*. 184:266–277.
- 146.** Jaramillo, L., Díaz, F; Hernández, P; Debray, H; Trigo, F; Mendoza, G; Zenteno, E. 2000. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology*. 10 (1): 31-37
- 147.** Lo, R. C.Y. and Mellors, A., 1996. The isolation of recombinant plasmids expressing secreted antigens of *Pasteurella haemolytica* A1 and the characterization of an immunogenic 60 kDa antigen. *Veterinary Microbiology* 51: 381-391.
- 148.** Breider, M. A., Kumar, S. and Corstvet, R. E., 1990. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. *Infect. Immun*. 58: 1671-1677

- 149.** Brogden, K. A., Debey, B. and Cutlip, R. 1995. Lesions induced *in vivo* by cell associated products of *Pasteurella haemolytica* and their role in the pathogenesis of bovine respiratory disease. Memorias del Seminario de Pasteurelisis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, N.L., México 23-29. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., México.
- 150.** Yoo, H. S., Maheswaran, S. K., Lin, G., Townsend, E. L. and Ames, T. R., 1995. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolisaccharide. Infect. Immun. 63:381-388
- 151.** Yoo, H. S., Rajagopal, B. S., Maheswaran, S. K., Srinand, S. and Ames, T. R., 1995. Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxine induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. Microb Pathog. 18: 237-242
- 152.** Ernst, R. K., Guina, T., and Miller, S. I., 2001. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: Role in resistance to host innate immunity. Microbes Infect. 3: 1327-1334
- 153.** Galderiro, M., Folgore, A., Moliterno, M., and Greco, R., 1999. Porins and lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella typhimurium* induce leucocyte transmigration through human endotelial cells in vivo. Clin. Exp. Immunol. 116: 453-461
- 154.** Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T., 2001. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. 2: 675-680
- 155.** Pettit, R. K. and Judd, R. C., 1992. The interaction of naturally elaborated blebs from serum-susceptible and serum resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* with normal human serum. Mol. Microbiol. 6: 729-734
- 156.** Hechtel, M., Dishon, T. and Braun, W., 1965. Influence of oligodeoxyribonucleotides on the immune response of newborn AKR mice. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 119:991-993
- 157.** Katz, D. H., Hamaoka, T., Dorf, M. E., .1973 Cell interaction between histoincompatible T and B Lymphocytes. IV. Involvement of immune response (Ir) gene control of lymphocyte interaction controlled by the gene. J. exp. MED. 138: 734-745
- 158.** Allison, A. G., 1973. Mechanisms of tolerance and autoimmunity. Ann. Rhewm. Dis. 32: 283-293.
- 159.** Messina, J. P., Gilkeson, G. S., Pisetsky, D, S., 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. J. Immunol. 147: 1759

- 160.** Sun, S., Beard, C., Jaenisch, R., Jones, P., Aprent, J., 1997. Mitogenicity of DNA from different organism for murine B cell. *J. Immunol* 159:3119
- 161.** Sparwasser, T., Koch, E, S., Vabulas, R, M., Heeg, K., Lipford, G, B., Ellwart, J, W., Wagner, H., 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cell. *Eur. J. Immunol* 28:2045
- 162.** Rosenqvist, E., HØiby, A. E., Wedege, E., Bryn, K., Kolberg, J., Klem, A., RØnnild, E., Bjune, G. and NØkleby, H. 1995. Human antibody Responses to Meningococcal Outer Membrane Antigens after Three Doses of the Norwegian Group B Meningococcal Vaccine. *Infect. Immun.* Vol. 63, No 12. P 4642-4652
- 163.** Frank G.H., Briggs R.E., Loan R.W., Purdy C.W., Zehr E.S., 1996. Respiratory tract disease and mucosal colonization by *Pasteurella haemolytica* in transported cattle, *Am.J. Vet. Res.* 57, 1317–1320.
- 164.** Confer, A. W., Panciera, J. R., Clinkenbeard, D. K. and Moiser, A. D., 1990. Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Vet. Tres.* 54: S48-S52
- 165.** Rehmtulla, A. J., and Thomson, G. R., 1981. A review of the lesions in shipping fever of cattle. *Can. Vet. J.* 22:1-8
- 166.** Moiser, D. A., Simons, K. R., Confer, A. W., Panciera, R. J., Clinkenbeard, K. D., 1989. Serum IgG and IgM antibody response in cattle to antigens of *Pasteurella haemolytica*. *Vet. Immunol Immunopathol.* 22: 53-65
- 167.** Moiser DA, Confer AW, Panciera RJ, 1989. The evolution of vaccines for pneumonic pasteurellosis. *Res Vet Sci.* 47: 1-11
- 168.** Donachie. W y Gilmur. N. J. L., 1988. Sheep antibody response to cell wall antigens expressed *in vivo* by *Pasteurella haemolytica* serotype A2, *FEMS Microbiol Lett.*, 56: 271-276
- 169.** Sabri, Y. I., Zamri-Saad, M., Mutalib, A. R., Israf, D. A., and Muniandy, N. 2000. Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9- enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet. Microbiol.* 73(1): 13-23
- 170.** Saunders, N. B., Shoemaker, D. R., Brandt, B. L., Moran, E. E., Larsen, T., and Zollinger, W. D., 1999. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. *Infect. Immun.* 67: 113-119

- 171.** Haneberg, B., Dalseg, R., Wedege, E., HØiby, A. E., Haugen, L. I., Oftung, F., Andersen, R. S., Naess, M. L., Aase, A., Michaelsen, E. T., and Holst, J., 1998. Intranasal administration of a Meningococcal outer membrane vesicles vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. *Infect. Immun.* Vol.66: 1334-1341.
- 172.** Abbas, K. A., Lichtman, H. A. And Pober, S. J., 1999. *Inmunología Celular y Molecular*. Tercera edición. Interamericana- McGraw- Hill. Madrid; España.