

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

“Determinación de anticuerpos contra Proteínas de Membrana Externa de *Mannheimia haemolytica* en borregos vacunados contra la Pasteurelisis Neumónica”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ SERRANO**

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DEDICATORIAS

*A Dios por concederme ese don tan maravilloso que es la vida y permitirme tener logros como este, en ella.*

*A mi madre biológica, por haberme dado esta oportunidad tan fantástica.*

*A mi Papá Cabral<sup>†</sup> y a mis mamás Mago<sup>†</sup> y Chofi<sup>†</sup>, por enseñarme lo maravillosa que es la vida, alimentándome siempre con su sabiduría y amor; por contribuir en mi formación como persona y darme las armas para poder enfrentarme a la vida misma.*

*A mi familia: mi tía Joaquina<sup>†</sup>, tía Paquis, mis primos-hermanos Estela, Ángel y Monyn y a Marco; por su apoyo, su amor y comprensión, por forjar en mí ese gran espíritu de superación y de búsqueda por la vida.*

*A mis tíos en general: Nico y Adela, Miguel y Chela, Geras y Lupita, Lalo y Lupita, Lourdes y Pancho, y a todos mis primos por su apoyo brindado, gracias por impulsar mis sueños.*

*A "Pátaro", por tus comentarios, tu apoyo y comprensión, por tu tiempo y dedicación, porque has sido un ejemplo a seguir; pero sobre todo, gracias por tu AMISTAD.*

*GRACIAS Y QUE DIOS LOS BENDIGA HOY Y SIEMPRE*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis amigos y amigas que en el trayecto de todos estos años han contribuido con una sonrisa, una palmada en la espalda y palabras de aliento que sí bien, en su momento fueron las más oportunas para salir de las adversidades y juntos alcanzar grandes logros como éste.*

*Lucía, María Luisa, Carolina Méndez, Vanne, Georgia, Abraham, Jesús, Marlene, Adriana Medrano, Gladys, José, Paco Baños, Carlos, Osvaldo Sánchez, Miryí, Angel, Juanito, Mariano<sup>†</sup>, Humberto, Jehielí, Adriana Herrera, Ángeles, América Ríos, Oscar Molina, Lupita T., Geras, Arge, Dey, Gustavo, Delman, Carolina Soto, Ernesto Valencia, Marisol Morales, Pátaro M., Elizabeth Urbina “Peñas”, Heidi, Olga, Armando, Laura, Griselda, Noemí, Fanny, Rosy, Polo, Marce, Lauris, Eri, Señora Silvia, Don Moy, Marcos, Claus, Josué, Cristi, Tere Flores, Josefina Delgado y Josefina Álvarez, Ernesto Pedro, Familia Gaona Cerna, Pablo Campos, a mis compañeros del CEVET, mis alumnos de primero y segundo de la EP y a todos aquellos que me han brindado ese tesoro tan maravilloso que es su AMISTAD.*

*A mi maravillosa Facultad “La FES-C” por cobijarme en sus aulas, y a los doctores que contribuyeron en mi formación académica; particularmente a los Drs. Gerardo García Tovar, Pablo Martínez Labat, Alfredo Cuéllar, Oscar Molina, Francisco Morales, Juan Carlos del Río, Ignacio, Patricia Mora, Jaime Orozco, García Alcaráz, y Guillermo Oviedo.*

*A mis Sinodales los Drs. Citlali, José M. Rojo, Francisco Morales, Oscar Chávez y Frank Díaz, por su tiempo y dedicación para leer y hacer las correcciones y los comentarios oportunos para la mejora de este trabajo.*

*A los Drs. y amigos que me apoyaron en mi proceso de formación, en la práctica y en la teoría externos a la FES-C: Dra, Medory Moreno, Dr. Oscar Pérez, Dra. Rosaura Romero, a mis primos los Drs. Estela y Marco que son un gran ejemplo a seguir como personas y como profesionistas.*

*Al INIFAP-CENTD Microbiología, por abrirme las puertas al conocimiento y a la ciencia, a los Drs. Que han estado también a mi lado brindándome su apoyo y su amistad, su tiempo, su dinamismo y comprensión, GRACIAS Drs. Beatriz Arellano, Efrén Díaz, Víctor Tenorio, Francisco Aguilar, Dionicio Córdoba, Arturo Mancera y Enrique Herrera.*

*Y a las personas que me han dado el regalo más maravilloso que he recibido en la vida y de quien no pienso separarme jamás; a los Pbros. Agustín Reyes, Tonatiuh Montenegro, Daniel Navarrete, Pedro Reyes, Francisco Merino, Tomás Montesinos, Rubén Darío, Manuel, Díacs. Juan y Josafat, Hnas. Laura y Gaby, y a todos aquellos que me han acercado a Dios. Gracias por ese regalo y por su AMISTAD, han sido una bendición en mi vida.*

*A mis enanos Nabiky, Mougly, Katy, Negra, Tamarindo, Clavesina y Clavesín; y a todos aquellos animalitos que contribuyeron con un poco de sí para mi formación profesional y en la realización de éste trabajo.*

*Y porque la vida no cesó tras tu partida, porque fuiste algo maravilloso en mi vida y hoy la habitas como un recuerdo excepcional... ASRA, GRACIAS....*

**GRACIAS Y QUE DIOS LOS BENDIGA HOY Y SIEMPRE**

*“JUNTO A TÍ, BAJO EL COBIJO DE TUS BRAZOS SE  
ENCUENTRA MI VIDA, Y ES ESTO, LO QUE ME DA  
FORTALEZA Y ME LLENA DE ALEGRÍA, LO QUE ME HACE  
SENTIR CAPAZ DE TODO. QUIZÁ EL PASO POR ESTE MUNDO,  
NO ES MÁS QUE UNA PERPETUA LUCHA POR LA  
SUPERVIVENCIA. SUPERVIVENCIA A LOS PROPIOS  
FRACASOS, A LOS AMORES, A LAS PÉRDIDAS, AL MIEDO.  
SER ARRASADOS POR LOS VOLCANES QUE SE DESATAN EN  
NUESTRO INTERIOR Y TENER LA VALENTÍA DE  
LEVANTARNOS PARA COMENZAR DE CERO.  
RECONSTRUIRNOS A NOSOTROS MISMOS UNA Y OTRA VEZ,  
FORTALECIÉNDONOS DESPUÉS DE CADA CAÍDA, DE CADA  
TRIUNFO, DE CADA DERROTA. SER MÁS FUERTES Y  
HUMILDES, PARA CONVERTIRNOS EN INDIVIDUOS MÁS  
SABIOS, PERO CON LA CANDIDEZ DEL INGENUO QUE NO  
PIERDE LA CAPACIDAD DE ASOMBRO. PORQUE TODO SE  
PUEDE CUANDO SE PIERDE EL TÉMOR A NO LOGRARLO Y  
SE DESCUBRE, COMO EN UNA REVELACIÓN QUE NO HAY  
PODER MÁS GRANDE QUE LAS GANAS DE VIVIR, DE SABER  
QUE LA VOLUNTAD ES LA FUERZA MOTRIZ QUE TODO LO  
PUEDE, Y CON ELLO, DECIRSE A DIARIO: HOY ES UN GRAN  
DÍA PARA EMPEZAR”*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Resumen</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Introducción	<b>1</b>
<b>1.1</b>	Factores Predisponentes	<b>1</b>
<b>1.2</b>	Generalidades del microorganismo	<b>2</b>
<b>1.3</b>	Patogénesis	<b>4</b>
<b>1.4</b>	Prevención	<b>6</b>
<b>2</b>	Justificación	<b>8</b>
<b>3</b>	Objetivos	<b>9</b>
<b>3.1</b>	Objetivo General	<b>9</b>
<b>3.2</b>	Objetivos Particulares	<b>9</b>
<b>4</b>	Hipótesis	<b>9</b>
<b>5</b>	Materiales y Métodos	<b>10</b>
<b>5.1</b>	Descripción y Localización de las Explotaciones involucradas	<b>10</b>
<b>5.1.1</b>	Rancho 1: La Mora	<b>10</b>
<b>5.1.2</b>	Rancho 2: Los Álamos	<b>11</b>
<b>5.1.3</b>	Rancho 3: Santa Rebeca	<b>12</b>
<b>5.2</b>	Animales	<b>14</b>
<b>5.3</b>	Inmunógenos	<b>14</b>
<b>5.4</b>	Obtención de proteínas de membrana externa (PME) de <i>Mannheimia haemolytica</i> .	<b>16</b>
<b>5.5</b>	Corrimiento electroforético para el análisis cuantitativo de proteínas	<b>17</b>
<b>5.6</b>	Cuantificación de Proteínas	<b>18</b>
<b>5.7</b>	ELISA - Indirecta para la detección de anticuerpos contra PME en borregos vacunados.	<b>19</b>
<b>5.8</b>	Inmunotransferencia	<b>20</b>
<b>5.9</b>	Hiperinmunización de borregos para la obtención de sueros control positivo	<b>21</b>
<b>5.10</b>	Análisis Estadístico	<b>21</b>
<b>6</b>	Resultados	<b>22</b>
<b>6.1</b>	Obtención de proteínas de membrana externa de <i>Mannheimia haemolytica</i> .	<b>22</b>
<b>6.2</b>	Estandarización de la técnica de ELISA - indirecta	<b>22</b>

<b>6.3</b>	Determinación de anticuerpos con las PME de <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipos A1 y A2 en sueros de borregos vacunados	<b>23</b>
<b>6.4</b>	Reconocimiento de las PME de <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipos A1 y A2 en borregas vacunadas, mediante la técnica de Inmunotransferencia	<b>25</b>
<b>7</b>	Discusión	<b>40</b>
<b>8</b>	Conclusiones	<b>45</b>
<b>9</b>	Literatura citada	<b>46</b>
<b>10</b>	Apéndice	<b>53</b>

#### ÍNDICE DE TABLAS

		<b>Página</b>
<b>TABLA 1</b>	Características de los inmunógenos utilizados para la detección de anticuerpos contra PME de <i>M. haemolytica</i>	<b>15</b>
<b>TABLA 2</b>	Calendario de Inmunización	<b>16</b>
<b>TABLA 3</b>	Microtécnica en una placa de 96 pozos	<b>18</b>



## ÍNDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS

		Página
<b>GRÁFICO 1</b>	Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados contra la Pasteurelosis neumónica.	<b>27</b>
<b>GRÁFICO 2</b>	Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados contra la Pasteurelosis neumónica.	<b>28</b>
<b>GRÁFICO 3</b>	Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados contra la Pasteurelosis neumónica.	<b>29</b>
<b>GRÁFICO 4</b>	Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados contra la Pasteurelosis neumónica.	<b>30</b>
<b>GRÁFICO 5</b>	Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados contra la Pasteurelosis neumónica.	<b>31</b>
<b>GRÁFICO 6</b>	Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados contra la Pasteurelosis neumónica.	<b>32</b>
<b>GRÁFICO 7</b>	Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados contra la Pasteurelosis neumónica.	<b>33</b>
<b>GRÁFICO 8</b>	Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados contra la Pasteurelosis neumónica.	<b>34</b>
<b>FIGURA 1</b>	Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico Experimental, utilizando las PME de <i>Mannheimia haemolytica</i> como antígeno.	<b>35</b>
<b>FIGURA 2</b>	Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico Rodeo 9, utilizando las PME de <i>Mannheimia haemolytica</i> como antígeno.	<b>36</b>
<b>FIGURA 3</b>	Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico One Shot, utilizando las PME de <i>Mannheimia haemolytica</i> como antígeno.	<b>37</b>
<b>FIGURA 4</b>	Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico Bact 3, utilizando las PME de <i>Mannheimia haemolytica</i> como antígeno.	<b>38</b>
<b>FIGURA 5</b>	Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico Chino-in, utilizando las PME de <i>Mannheimia haemolytica</i> como antígeno.	<b>39</b>

## RESUMEN

El efecto de las neumonías en animales domésticos es de gran importancia, ya que afecta directamente el proceso productivo de las explotaciones comerciales. En este trabajo se evaluó la respuesta serológica hacia las Proteínas de Membrana Externa (PME) *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2 en corderos vacunados. En tres ranchos se hicieron 6 grupos de 10 animales cada uno; se inoculó un biológico diferente a cada uno de los grupos, la dosis administrada fue de 2-2.5ml vía subcutánea; se realizaron 4 muestreos con un espacio de 15 días entre cada muestreo hasta completar un total de cuatro muestreos. La presencia de anticuerpos contra PME se determinó con la técnica de ELISA indirecta, con la que se pudo observar que tanto en los ranchos de Tlaxcala como en el rancho 3, el grupo inoculado con el biológico "One Shot", muestra una mayor respuesta contra el antígeno del serotipo A1.

Para el caso del serotipo A2, en el rancho 1, el mejor biológico fue el "One Shot", con una Densidad Óptica (D.O.) mayor a los 0.500 nm; en el rancho 2, "Rodeo 9" mostró mayor respuesta al antígeno y, para el caso del rancho 3, el biológico "Chinoín" fue el que mostró mejor comportamiento. El grupo control se mantuvo constante en todos los casos sin mostrar cambios significativos durante todo el proceso de evaluación. Mediante la técnica de PAGE-SDS, se identificaron proteínas de *M. haemolytica* serotipos A1 y A2. Se realizaron inmunotransferencias con los sueros de los animales que resultaron con mayor título de anticuerpos en la técnica de ELISA indirecta, mostrándose un reconocimiento para proteínas de 123.16 KDa y de 49.68 KDa en la mayoría de los grupos. También hubo reconocimiento hacia una proteína de 114.19 KDa, misma que aparece únicamente en el caso del biológico "Bact 3" con el antígeno A2. Los resultados de éste trabajo muestran un reconocimiento de anticuerpos hacia algunas PME de *M. haemolytica*, tanto para el serotipo A1 como para el A2; sin embargo, resultaría de interés elaborar un biológico a base de estos antígenos y hacer una evaluación del mismo.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las bajas en la producción en explotaciones comerciales son principalmente por problemas de tipo respiratorio; aquellos que logran sobrevivir al proceso infeccioso manifiestan un bajo rendimiento productivo; no solo por la disminución en ganancias de peso, sino también porque hay menor eficiencia en la conversión alimenticia; esto aunado a los costos del tratamiento específico de la enfermedad, en animales afectados con procesos neumónicos crónicos o bien por la muerte del animal.<sup>1</sup>

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.

La primera información de la enfermedad se describe en 1921, donde se aisló el germen del pulmón de rumiantes; en 1932 se propuso el nombre de *Pasteurella haemolytica*.<sup>3,4</sup>

### 1.1 Factores predisponentes

Esta enfermedad es inducida por múltiples factores predisponentes de tipo estresante que se combinan con agentes infecciosos de tipo primario y secundario así como microorganismos oportunistas; éstos últimos se establecen después de que se ha desarrollado la infección inicial. Generalmente los virus actúan como agentes primarios, facilitando así la infección o proliferación bacteriana (agentes secundarios); por esta razón se le ha denominado Complejo Respiratorio de Rumiantes.<sup>2</sup> Diversos estudios han demostrado que tanto *Mannheimia haemolytica* (antes *Pasteurella haemolytica*) como *Pasteurella multocida*, son los agentes etiológicos aislados con mayor frecuencia en neumonías de rumiantes<sup>1</sup>, ambas producen la enfermedad conocida como Pasteurelisis Neumónica.

Otros factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad son la mala alimentación,<sup>3</sup> el transporte de los animales, relacionándose éste último a las condiciones en las que se trasladan de un lugar a otro, tales como el hacinamiento, agotamiento, alimentación y bebida irregulares, cambios climáticos, carga y descarga de los animales.<sup>6</sup>

También influye la tecnificación en la producción pecuaria, la cual ofrece condiciones favorables para que la enfermedad se presente, ya que al igual que en las situaciones anteriores, se provoca estrés en el animal; este estado generalmente induce la liberación de esteroides, principalmente cortisol, el cual compromete aparentemente la capacidad inmunológica del hospedero en respuesta a los agentes infecciosos.

## **1.2 Generalidades del microorganismo**

Existen dos biotipos de *Mannheimia haemolytica* clasificados de acuerdo con su capacidad para fermentar arabinosa, llamado biotipo A y trehalosa, como biotipo T. Debido a diferencias en sus antígenos capsulares se reconocen 17 serotipos; los serotipos 3, 4, 10 y 15 pertenecen al biotipo T y los restantes al biotipo A. Los serotipos predominantes de esta bacteria en nuestro país, son: A1, A2, A5 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos.<sup>5,6,7,14</sup>

Actualmente las cepas de *M. haemolytica* únicamente del biotipo A, han sido reclasificadas en un nuevo género denominado *Mannheimia* el cual tiene cinco especies, *Mannheimia haemolytica*, donde se encuentran la mayoría de las cepas de referencia del biotipo A, todas arabinosa positivas; *M. glucosida* que incluye el serotipo A11; *M. granulomatis*, aislada de ganado bovino y lepóridos; *M. ruminalis*, que contiene cepas no hemolíticas aisladas de ganado bovino y ovino, así como *M. varigena*, aislada de bovinos y porcinos.<sup>8,9</sup>

*M. haemolytica* es un cocobacilo pleomórfico que muestra coloración bipolar con la tinción de Wright, anaerobios facultativos, gram-negativos, inmóviles no esporulados y capsulados, catalasa y oxidasa positivos, fermentan

glucosa y otros carbohidratos, producen ácido pero no gas, tampoco producen indol, son negativos a las pruebas de rojo de metilo, Voges-Proskauer y gelatinasa.

*M. haemolytica* produce una zona de hemólisis en placas de agar sangre, en este medio sus colonias son grisáceas, lisas, de apariencia mucóide, por lo general entre 2 y 3 mm de diámetro.<sup>5</sup>

Las bacterias del género *Mannheimia*, se localizan normalmente en las mucosas del aparato respiratorio alto de rumiantes, es decir, permanecen ahí sin causar daño; por lo que pueden aislarse de animales clínicamente sanos. Esta colonización resulta de un equilibrio entre el crecimiento bacteriano y la respuesta del hospedero que evita un crecimiento excesivo por mecanismos inmunes a nivel local;<sup>10</sup> además de que la porción distal de los sistemas de conducción, transición e intercambio son estériles en condiciones normales, debido a que los microorganismos que ingresan, fácilmente son removidos gracias a los mecanismos específicos e inespecíficos de defensa.<sup>11</sup>

A este nivel, existen otros mecanismos defensivos capaces de neutralizar a las bacterias; siendo el macrófago alveolar el principal responsable de esta inactivación;<sup>12</sup> sin embargo, algunos microorganismos logran alcanzar las partes más profundas del pulmón; esto depende en gran parte del tamaño del microorganismo. Las partículas más grandes generalmente se depositan en el *mucus* que cubre el epitelio ciliado; las más pequeñas, pueden alcanzar los espacios alveolares; pero la mayor parte son expiradas; por lo que resulta mínima la infección de la zona alveolar, siendo innecesaria una movilización excesiva de los macrófagos.<sup>9</sup>

### 1.3 Patogénesis

En la patogénesis de la enfermedad existen múltiples interacciones hospedero-bacteria, que se inician con la inhalación del agente, la colonización nasofaríngea, la llegada al alveolo, la respuesta a la colonización y finalmente último culmina con la evasión bacteriana a las defensas del hospedero.<sup>10</sup>

Se han realizado numerosos estudios para determinar los mecanismos que permiten a la bacteria establecerse y diseminarse durante una infección, sin embargo, la patogénesis de la Pasteurelosis neumónica aún es poco clara.<sup>13</sup>

Diversos factores de virulencia han sido asociados a *M. haemolytica* entre los que se incluyen una exotoxina también llamada leucotoxina,<sup>14</sup> producida durante la fase logarítmica de crecimiento (de 5 a 6 horas de cultivo\*), considerada como el principal factor de virulencia de la bacteria<sup>19</sup>, además de estar relacionada con todos los serotipos desde el punto de vista genético, funcional e inmunológico<sup>15</sup>; también ha resultado ser tóxica para los neutrófilos y leucocitos de rumiantes. Con la muerte de éstas células, también se liberan enzimas proteolíticas, histamina y otros mediadores químicos del proceso inflamatorio que contribuyen al daño pulmonar.<sup>20</sup> También presenta una estructura compuesta por lipopolisácarido con actividad endotóxica, que induce efectos vasculares locales o sistémicos, es uno de los mayores determinantes antigénicos que el sistema inmune del animal reconoce, además de las proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PRH), plásmidos de resistencia a quimioterapéuticos, antígenos aglutinantes serotipo-específico, neuraminidasa y sialoglicoproteasa; la interacción de éstos y otros factores de virulencia con los componentes de los alveolos pulmonares son discutidos como modelos para establecer la patogénesis de la pasteurelosis; además de estar involucrados en la colonización bacteriana, contribuyendo así en la presentación del cuadro neumónico.<sup>8, 14, 16, 17, 21.</sup>

Otros factores de virulencia que, se han descrito incluyen, enzimas proteolíticas,<sup>16</sup> una cápsula de polisacáridos que protege a la bacteria contra la fagocitosis y efectos opsonizantes; además su glicocálix que le permite adherirse y ejercer directamente su efecto citopático sobre las células blanco.<sup>16,17</sup>

Algunos estudios sobre la interacción *M. haemolytica*-hospedador, han ayudado a entender y resolver algunas preguntas sobre las fases tempranas de la patogénesis de la pasteurelisis neumónica; sin embargo los eventos en nasofaringe que permiten la proliferación de *M. haemolytica*, aún no son del todo conocidos. Estudios recientes sugieren que el estrés y las infecciones virales, estimulan la actividad de elastasa en la mucosa nasal del hospedador, lo cual puede disminuir las concentraciones de fibronectina y el incremento en la adherencia de *M. haemolytica*.<sup>22</sup> Adicionalmente, la neuraminidasa y la glicoproteasa producidas por *M. haemolytica* pueden alterar las glicoproteínas de superficie de las células y la secreción de tipo mucosa, incrementando la adherencia de *M. haemolytica* al moco o al epitelio nasal.<sup>23</sup>

La neumonía causada por *M. haemolytica* se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa severa. También se pueden aislar de neumonías supurativas focales y difusas, hasta cuadros donde existen lesiones vasculares con trombosis y hemorragias, en los que adicionalmente se puede observar la transformación de macrófagos con aspecto arremolinado o de "avena". Se cree que este último cambio se debe al efecto tóxico de la leucotoxina que produce *M. haemolytica*.<sup>18,24</sup>

Las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* pueden estar involucradas en la sensibilización de anticuerpos presentes en suero<sup>19, 20</sup> por lo que pueden considerarse como antígenos protectores. Los anticuerpos dirigidos a dichos antígenos son capaces de inducir la fagocitosis y activar el complemento.<sup>20</sup>

Como resultado a la exposición de estas proteínas por parte de la bacteria, es que se consideran importantes candidatas para la elaboración de vacunas.

## 1.4 Prevención

La inmunización es reconocida como el mejor método para la prevención de neumonía causada por *M. haemolytica*, dado que ante un brote de esa enfermedad algunos animales mueren, otros enferman y se recuperan y al parecer otros no manifiestan signos clínicos, por esta razón las investigaciones se han concentrado en la identificación y caracterización de inmunógenos potencialmente protectivos en cepas de origen ovino y bovino.<sup>25</sup> Este método de prevención se ve obstaculizado por la carencia de vacunas eficientes y seguras. Pese a que las vacunas comercialmente disponibles, pueden inducir inmunidad, la reacción que se produce, es limitada al serotipo específico; mientras la protección cruzada contra otros serotipos, aún no ha sido posible.

Las bacterinas comerciales son preparaciones con más de un antígeno y complementadas con un adyuvante; no obstante, el rango de protección cruzada conseguido por éste tipo de biológicos, sigue siendo limitado.<sup>26</sup>

La comprensión de los factores de virulencia de los agentes infecciosos, combinado con un mejor conocimiento de la respuesta inmune, ha creado una revolución en el número de nuevos agentes que pueden ser potencialmente controlados por inmunización.<sup>27</sup>

El uso de bacterinas se va desechando día con día, pues no han tenido efecto en la prevención del problema. Evidencias clínicas muestran que animales bacterinizados han desarrollado una neumonía más severa al desafío, comparado con los animales no bacterinizados. A pesar de lo anterior, en México se siguen utilizando las bacterinas, sin saber a ciencia cierta su efectividad, serotipos utilizados y las características de las cepas contenidas.

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* o las proteínas de membrana externa; no hay que olvidar que los antígenos capsulares, entre otros, también son importantes, siendo éstos específicos del serotipo de la bacteria.<sup>28</sup>



Los inmunógenos a base de bacterias vivas y obtenidos a partir de cultivos de 6 horas, 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, citotoxina y otros carbohidratos aún no muy bien definidos); además de que la replicación del agente favorece la estimulación de los mecanismos inmunológicos mediados por células.<sup>27</sup>

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las bacterinas contra la Pasteurelosis en ovinos han sido usadas durante décadas, pero su eficacia sigue siendo cuestionada.

Actualmente, se han desarrollado diversos inmunógenos para prevenir las neumonías por *Mannheimia haemolytica* en rumiantes, con resultados aparentemente satisfactorios. En algunos casos, se han utilizado como antígenos: bacteria viva, bacteria muerta, material capsular, extractos bacterianos y leucotoxina cruda, además de probar diferentes rutas de administración como la vía oral<sup>29</sup> y usar adyuvantes sintéticos.<sup>30</sup>

Las proteínas de membrana externa de *Mannheimia haemolytica* se han considerado como importantes inmunógenos para inducir protección contra la Pasteurelosis neumónica; por lo que en diversos estudios, se ha propuesto la identificación de diversos antígenos expuestos en la superficie de *Mannheimia haemolytica*, que podrían llegar a ser un instrumento de gran importancia en el desarrollo de biológicos protectores contra dicha enfermedad.<sup>31</sup>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar si hay respuesta de anticuerpos contra proteínas de membrana externa (PME) de *Mannheimia haemolytica* mediante las técnicas de ELISA-Indirecta e Inmunoblot en sueros de ovinos inmunizados con cinco vacunas utilizadas para la prevención de la Pasteurelisis.

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener proteínas de membrana externa a partir de cultivos puros de *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2, para utilizarlas como antígenos en las técnicas de ELISA-Indirecta e Inmunoblot.
- Determinar el reconocimiento de anticuerpos contra éstos antígenos en el suero de los diferentes grupos muestreados.

### **4. HIPOTESIS**

Si las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad; entonces en animales vacunados con biológicos que previenen la enfermedad, es posible encontrar la presencia de anticuerpos específicos contra estas proteínas.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

Previo al presente trabajo se desarrolló una tesis en la que se evaluaron de manera comparativa cinco biológicos utilizados para prevenir la Pasteurelisis Neumónica.<sup>52</sup>

El objetivo de dicho trabajo fue determinar la efectividad de cuatro biológicos comerciales de diferentes laboratorios, además de uno experimental desarrollado en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), utilizados para la prevención de la Pasteurelisis Neumónica en ovinos. Los sueros obtenidos para ese trabajo fueron empleados en la presente investigación para determinar la presencia de anticuerpos contra proteínas de membrana externa de *Mannheimia haemolytica*.

Cabe señalar que fueron tres explotaciones ovinas comerciales ubicadas, dos en el Estado de Tlaxcala (Ranchos 1 y 2) y una en el Estado de México (Rancho 3).

### **5.1 Descripción y Localización de las Explotaciones involucradas**

#### **5.1.1 Rancho 1: *La Mora***

El Rancho 1 se ubica en la población de Santiago Cuautlalpan perteneciente al municipio de Tepetzotlán, México. Esta unidad productiva cuenta con 150 animales, tiene como fin zootécnico producción de corderos para abasto; cuenta con un sistema de pastoreo diurno (pastos nativos) y encierro nocturno. Las ovejas por parir y lactando permanecen en confinamiento (aproximadamente tres meses).

Los corrales de alojamiento nocturno y para las ovejas por parir y lactando poseen piso de cemento, están cercados con barda de ladrillo y al frente tienen malla ciclónica. El techo es de lámina galvanizada. Los

comederos son de tolva (para el alimento balanceado) y de varilla (para el forraje). El agua se ofrece a libertad en bebederos automáticos de pivote.

Las ovejas gestantes se separan aproximadamente un mes antes de que ocurra el parto, en la mayoría de las ocasiones se toma en cuenta el desarrollo de la glándula mamaria (cuando está *ubrada*). Cuando eso ocurre, se les ofrece entre 500 y 750 g de alimento balanceado comercial (16% de proteína cruda) y forraje molido (alfalfa achicalada o rastrojo de maíz) a libertad.

Se registran los partos que van ocurriendo, anotando la fecha, número de la oveja, tipo de parto, sexo de la cría, peso y número del cordero. A los corderos recién nacidos, al momento del aretado y pesado, se les administra selenito de sodio (1 mg) por vía Intramuscular. Cuando el corderito proviene del resultado de la crucea con carneros de razas laneras se descolan empleando la pinza burdizo. A los 30 y 60 días después del nacimiento, se les repite la aplicación de selenio a los corderos.

El manejo sanitario del rebaño consiste en la desparasitación, para la cual se realizan muestreos de heces mensualmente por parte de los médicos encargados, para determinar la carga parasitaria y así realizar la desparasitación específica en caso necesario.

En cuanto a la inmunización, se aplica leucotoxide contra *Mannheimia haemolytica* para prevenir neumonías a todo el rebaño. A las ovejas cuando falta aproximadamente un mes para el parto y a los corderos en el momento del destete (entre los 60 y 75 días).

### **5.1.2 Rancho 2: Los Álamos**

El Rancho 2 se ubica en la localidad de Huamantla, cabecera municipal de Huamantla, estado de Tlaxcala. El propósito productivo de esa unidad de producción es la generación de corderos para el abasto, cuenta con 480 animales, donde el tipo de ganado es de pelo, predominando el ganado

tabasco. El ganado reproductor es alimentado principalmente mediante pastoreo diurno en praderas mixtas implantadas e irrigadas, incorporándolas a los corrales después de las cinco de la tarde, donde son suplementadas con ensilaje de maíz y premezcla mineral, comercial. Para el caso de gestantes en el último tercio de preñez y las lactantes, reciben además del ensilaje, un suplemento con granos, desperdicio de frituras y pasta de soya. Las hembras recién paridas hasta que cumplen cinco días de lactancia permanecen estabuladas con sus corderos, recibiendo tres veces la ración de suplemento, posteriormente se incorporan al rebaño general.

Los corrales para el alojamiento nocturno y para las ovejas recién paridas, eran en su construcción original instalaciones para cerdos con piso de cemento, además están cercados con barda de ladrillo y con salida hacia asoleaderos. El techo es de lámina galvanizada. Los comederos son de tolva y el aguase ofrece en medios tambos.

Los corderos recién nacidos son aretados, pesados y se les administra selenito de sodio (1 mg) por vía Intramuscular. El corral para las hembras paridas cuenta con un área exclusiva para corderos donde se les da un alimento a base de grano, pasta de soya, desperdicio de frituras y minerales; los corderos son separados cuando cumplen 15 días de nacidos.

El manejo sanitario del rebaño consiste en la desparasitación, la cual se efectúa dos veces al año, no usan el mismo producto de manera consecutiva y a los corderos cuando cumplen dos meses de edad se destetan, y se les aplica una bacterina toxoide para la prevención de enterotoxemia.

### **5.1.3 Rancho 3: Santa Rebeca**

El Rancho 3 se ubica en la localidad de Cuapixtla, cabecera municipal de Cuapixtla, estado de Tlaxcala. El propósito productivo de esa unidad de producción es la generación de corderos para el abasto, cuenta con 1500 cabezas. El ganado reproductor es alimentado principalmente mediante pastoreo diurno en praderas mixtas implantadas e irrigadas, incorporándolas a

los corrales por la tarde, donde son suplementadas con ensilaje de maíz, un suplemento a base de grano, pasta de soya y alfalfa; así como una premezcla mineral comercial.

Las hembras recién paridas y hasta que cumplen cinco días de lactancia permanecen estabuladas con sus corderos, recibiendo tres veces la ración de suplemento, posteriormente se incorporan al rebaño general.

Los corrales de alojamiento nocturno y para las ovejas recién paridas, consisten en una barda perimetral de block y techos de lámina galvanizada; cuentan con comederos de concreto y los bebederos son de medios tambos.

En cuanto a los corderos recién nacidos, se les administra selenito de sodio (1 mg) por vía Intramuscular. Cuando cumplen 15 días de edad, se instalan trampas exclutorias para la suplementación predestete, con un alimento a base de grano, pasta de soya, y minerales.

Por otra parte, el manejo sanitario del rebaño consiste en la desparasitación, la cual se efectúa dos veces al año, intercalando el desparasitante de manera consecutiva para evitar la resistencia. Cuando cumplen dos meses de edad, los corderos son vacunados con una bacterina-toxoide para la prevención de enterotoxemia.

## 5.2 ANIMALES

Los animales utilizados en ese estudio, eran corderos que se encontraban clínicamente sanos, su edad oscilaba entre 2 y 4 meses; eran de ambos sexos y todos provenían de las explotaciones ya descritas.

Se utilizaron 180 corderos por rancho, mismos que fueron distribuidos de manera aleatoria en 6 grupos de 30 ovinos cada uno.

## 5.3 INMUNÓGENOS:

Se utilizó un inmunógeno experimental realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y 4 inmunógenos comerciales además del grupo control.

El inmunógeno experimental es una bacterina-toxoide, la cual es una suspensión de bacterias inactivadas con formol al 0.3 % a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml y que contiene *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2, *Pasteurella multocida* y un sobrenadante rico en leucotoxina obtenido en fase de crecimiento logarítmico.

- Las bacterinas fueron inoculadas vía subcutánea de 2.0 a 2.5 ml según especificaciones de cada uno de los laboratorios comerciales. El biológico experimental también se administró vía subcutánea (2 ml) y el grupo control fue inoculado con solución salina fisiológica.
- La concentración de bacterias en cada vacuna no la especifica el laboratorio, sin embargo, los requisitos que establece la norma para la producción de biológicos manejan  $1 \times 10^9$  UFC x ml como mínimo para autorizar a la venta un biológico.<sup>51</sup>



A continuación se hace una descripción de cada uno de los inmunógenos utilizados para la detección de anticuerpos específicos contra PME de *M. haemolytica* presentes en suero de los animales inoculados.

**TABLA 1: Características de los inmunógenos utilizados para la detección de anticuerpos contra PME de *M. haemolytica***

GRUPO	INMUNOGENO	CARACTERÍSTICAS DEL BIOLÓGICO	DOSIS Y VÍA DE APLICACIÓN
1	“Experimental” INIFAP	Inmunógeno elaborado a base de bacterias muertas formalizadas de <i>M. haemolytica</i> , serotipo A1 y A2, además de contener un sobrenadante rico en leucotoxina, obtenida en la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria. Recomendado su uso en bovinos, ovinos y caprinos.	2.0 ml S.C.
2	“Rodeo-9” Norvet S.A de C.V.	Fórmula: Cada dosis contiene <i>M. haemolytica</i> tipo 1, <i>P. multocida</i> serotipo A, <i>P. multocida</i> serotipo D, <i>Haemophilus somnus</i> , <i>Cl. chauvoei</i> , <i>Cl. septicum</i> , <i>Cl. novyi</i> , <i>Cl. sordelli</i> , <i>Cl. perfringens</i> A y C, e hidróxido de aluminio como adyuvante. Recomendado su uso en bovinos, ovinos y caprinos.	2.0 ml S.C.
3	“One Shot” Pfizer	Bacterina toxoide de <i>M. haemolytica</i> tipo A1 propagado para incrementar la producción de leucotoxinas y antígenos capsulares y asociados a la célula bacteriana. Recomendado su uso en bovinos.	2.0 ml S.C.
4	“Bac-tres-golfo”	Fórmula: Suspensión de cepas inactivadas y absorbidas en adyuvante	2.0 ml S.C.

	Denkall Dawes Vet.	oleoso de <i>Cl. chauvoei</i> , <i>Cl. septicum</i> , <i>P. multocida</i> A3 y <i>M. haemolytica</i> A1. Recomendado su uso en bovinos, ovinos y caprinos.	
5	“Bacterina Doble PcE2” Chinoín Productos Farmacéuticos	Fórmula: cada ml contiene <i>M. haemolytica</i> A1, <i>P. multocida</i> serotipo A (Carter), <i>P. multocida</i> serotipo D (Carter), <i>Cl. chauvoei</i> y <i>Cl. septicum</i> . Recomendado su uso en bovinos, ovinos y caprinos.	2.5ml S.C.
6	Control	Éste grupo fue inoculado sólo con Solución Salina Fisiológica (SSF).	2.0ml

**TABLA 2. CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN**

Día	Gpo. 1	Gpo. 2	Gpo. 3	Gpo. 4	Gpo. 5	Control
0	Sangrado basal, vacunación y obtención del suero.					
15	Revacunación, sangrado y obtención del suero.					
30	Sangrado y obtención del suero y exudado nasal.					
45	Sangrado y obtención del suero.					

#### **5.4 Obtención de proteínas de membrana externa (PME) de *Mannheimia haemolytica*.**

Se hizo una preparación de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) con agar bacteriológico donde se sembraron los serotipos A1 y A2 de *Mannheimia haemolytica* (cepas de campo caracterizadas en el laboratorio); se incubaron a 37° C durante 24 hrs y se cosecharon en solución salina fisiológica donde se adicionó una mezcla comercial de inhibidores de proteasas la cual contiene inhibidores de serina, cisteína y metaloproteasas.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Complete, Lab. Roche)

Las bacterias fueron sonicadas a una potencia real de 100 watts, manteniendo la suspensión celular en un baño de hielo; repitiéndose así hasta completar 8 ciclos de 1 minuto, con 1 minuto de descanso entre cada ciclo; este procedimiento se repitió 8 veces, dando un total de 64 repeticiones.. Posterior a esto fueron, sometidas a 3 ciclos de 2 minutos con 30 segundos de reposo repitiendo el proceso 3 veces, para ello se empleó un generador Sonifier-450<sup>2</sup> equipado con una micropunta.

Únicamente al finalizar el 1<sup>er</sup> ciclo, las muestras fueron ultracongeladas con nitrógeno líquido durante 5 minutos y descongeladas rápidamente para favorecer la ruptura de las bacterias.

Una vez concluidos los ciclos, se hizo un frotis del sobrenadante, el cual fue teñido con la tinción de Gram para verificar el efecto de la sonicación.

Para la extracción de proteínas, las muestras sonicadas se centrifugaron a 4,424 xg por 15 minutos para remover restos celulares. El sobrenadante se colocó en una ultracentrifuga a 150,000 xg por 1 hora a 8° C. El sedimento corresponde a las membranas interna y externa, mientras que el sobrenadante a las proteínas del citosol. El paquete se resuspendió en 10 ml de Sarcosyl al 1% (N-Lauril-Sarcosina) manteniéndose en agitación suave por 30 minutos y se centrifugó nuevamente a 150,000 xg por 1 hora a 8° C, obteniendo en el paquete las proteínas de membrana externa, y en el sobrenadante las de membrana interna; la membrana externa, se resuspendió en 300 µl de HEPES 10mM, pH 7.5, con inhibidores de proteasas.

### **5.5 Corrimiento electroforético para el análisis cuantitativo de proteínas.**

Se realizaron en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio al 10% (PAGE-SDS). Se usó como marcador de peso molecular un producto

---

<sup>2</sup> (Branson Ultrasonic Co., Danbury, Co., EEUU)

comercial<sup>3</sup> elaborado especialmente para este tipo de geles. Se colocaron 10µl de la fracción de PME más 10µl de buffer de muestra en cada espacio del gel. El corrimiento fue a 80 volts por 20 minutos en el gel concentrador; posteriormente a 120 volts por una hora, hasta verificar que la muestra completara el recorrido del gel. Éste gel fue teñido con azul de Coomassie con la finalidad de identificar las PME.

## 5.6 Cuantificación de Proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó empleando el micrométodo de Bradford. En una placa de 96 pozos con fondo plano se realizó la siguiente distribución por duplicado:

- Primero se realizó una curva estándar de Albúmina Sérica Bovina (ASB); para esto, se adicionaron cantidades diferenciales de ASB en la primera fila de la placa (de 1 a 10µg); ajustando la cantidad a 10µl de suspensión en cada pozo con solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS 1X).
- Se agregaron a los mismos pozos 190µl del reactivo de Bradford.
- Para la cuantificación de proteínas, se colocaron 10µl de la suspensión de PME de *M. haemolytica* serotipos A1 y A2 en dos pozos diferentes.
- Se adicionó a cada una de estas muestras 190 µl de reactivo de Bradford
- La lectura se realizó en un lector de ELISA a una D.O. de 595 nm. Además de graficarse los datos obtenidos se hizo una regresión lineal obteniendo así la cantidad de proteína.

---

<sup>3</sup> (Amresco<sup>MR</sup> Inc.)

**Tabla 3. Microtécnica en una placa de 96 pozos.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	10 0 190	9 1 190	8 2 190	7 3 190	6 4 190	5 5 190	4 6 190	3 7 190	2 8 190	1 9 190	0 10 190	μG ASB μL DE PBS 1X REACTIVO DE BRADFORD.
<b>B</b>	10 0 190	9 1 190	8 2 190	7 3 190	6 4 190	5 5 190	4 6 190	3 7 190	2 8 190	1 9 190	0 10 190	μg ASB μl de PBS 1X Reactivo de Bradford.
<b>C</b>												
<b>D</b>												
<b>E</b>	A1	10 190	10 190									μl de suspensión (PME) Reactivo de Bradford
<b>F</b>	A2	10	10									μl de suspensión (PME) Reactivo de Bradford

### 5.7 ELISA - Indirecta para la detección de anticuerpos contra PME en borregos vacunados.

Para la estandarización de la prueba de ELISA-Indirecta se realizaron diluciones de 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 de los antígenos por separado (PME de los serotipos A1 y A2 de *Mannheimia haemolytica*); en el caso de los sueros controles positivos y negativos las diluciones fueron de 1:20, 1:40, 1:80, en solución de fosfato amortiguado salino (PBS 1x).<sup>4</sup> Para la evaluación, se realizó la técnica de ELISA descrita abajo, con la finalidad de obtener las diluciones con mejor respuesta.

La prueba de ELISA-Indirecta se realizó en microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con las fracciones de PME de los serotipos A1 y A2 de *Mannheimia haemolytica* como antígeno; para la sensibilización de la placa se pegó el antígeno diluido en proporción 1:100 en solución buferada de carbonato-bicarbonato pH 9.6; (Apéndice 3.3) la cual se dejó incubando durante toda la noche a 4° C, (las microplacas fueron selladas con plástico<sup>5</sup>

<sup>5</sup> (Parafilm "M"®)

para evitar la evaporación). Posteriormente se decantó el antígeno diluido de las placas y fueron lavadas 2 veces con solución de lavado (Apéndice 3.4); decantando la solución cada vez; enseguida se depositaron 50µl de los sueros problemas diluidos 1:80 en cada uno de los pozos de la microplaca y se dejaron incubando durante 30 minutos a 37° C. Los sobrenadantes fueron decantados y los pozos lavados 3 veces con la misma solución de lavado. Posteriormente se añadieron 50µl de proteína G conjugada con peroxidasa<sup>6</sup> diluida en proporción 1:1000 en solución de TRIS,<sup>6</sup> La microplaca se incubó 30 minutos a 37° C, se hicieron los lavados correspondientes y al finalizar el segundo lavado, se agregaron 100 µl a cada pozo de la solución substrato de ácido cítrico-peróxido de hidrógeno con el ABTS.<sup>7</sup> Se procedió a agitar la microplaca durante 10 minutos o hasta que el color verde de los controles apareció, la reacción se detuvo agregando 100 µl de ácido sulfúrico 3 N<sup>6</sup>

Se determinó el desarrollo de color en un espectrofotómetro por medidas de absorbancia a 405 nm.

### **5.8 Inmunotransferencia.**

Para la realización de esta prueba, se eligieron los sueros con mayor título de anticuerpos de cada grupo vacunado con los diferentes biológicos contra la Pasteurelisis Neumónica y que fueron detectados en la prueba de ELISA.

Los corrimientos electroforéticos de las PME se realizaron en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). Se colocaron 10 µg por pozo de la fracción de la PME y otros 10 µl del buffer de muestra<sup>6</sup> en cada espacio del gel.

El corrimiento fue a 80 volts por 20 minutos en el gel concentrador y posteriormente a 120 volts por una hora o hasta verificar que la muestra completara el recorrido del gel.

---

<sup>6</sup> (Sigma Company)

<sup>7</sup> (Fluka Biochemical)

Las proteínas de *Mannheimia haemolytica*, tanto serotipo A1 como A2, fueron transferidas por separado a membranas de nitrocelulosa por el método de transferencia semiseco usando una cubeta Trans-Blot SD<sup>8</sup>

Se montó la inmunotransferencia utilizando como metodología el sistema de emparedado.<sup>32,33</sup>

La transferencia se realizó a 15 voltios durante 1.5 horas. Terminado el tiempo de transferencia, la membrana fue tratada con leche descremada al 2% por 24 horas; se retiró la leche descremada, se lavaron las tiras de la membrana con TBS Tween 20 (Apéndice 5.3) por tres ocasiones y con PBS 1x por dos ocasiones, cada lavado tuvo una duración de 15 minutos realizándose éstas entre cada paso de la técnica. Posteriormente, se incubó toda la noche a 4° C con el suero de los animales vacunados con los diferentes biológicos. Después la membrana fue incubada con proteína G conjugada con peroxidasa diluida a 1:1000 y se incubó por dos horas a temperatura ambiente en agitación, y por último, se revelaron las proteínas con 3,3-Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.<sup>34, 35,36</sup> La reacción se detuvo con agua destilada al momento en que se hicieron visibles las bandas de reconocimiento.

### **5.9 Hiperinmunización de borregos para la obtención de sueros control positivo.**

Para la obtención del suero control positivo se hizo una preparación de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) con agar bacteriológico donde se sembraron los serotipos A1 y A2 de *Mannheimia haemolytica* por separado; se incubaron a 37° C durante 24 hrs. y se cosecharon en tubos "Falcon" con 5 ml de solución salina fisiológica estéril, posteriormente se ajustó la concentración de las bacterias a  $3 \times 10^9$  y se inocularon dos borregos con 2ml vía subcutánea repitiendo el proceso una vez más.

---

<sup>8</sup> (Bio-Rad Labs, Richmond, Calif, EEUU)

## **5.10 Análisis Estadístico**

El análisis de resultados se realizó por el método de análisis de varianza y las posibles diferencias entre medias se analizaron por pruebas de Duncan con el programa MED-CALC.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Obtención de proteínas de membrana externa de *Mannheimia haemolytica*.

Una vez obtenido el antígeno, se realizó la cuantificación de proteínas por el micrométodo de Bradford utilizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina, el cálculo de la concentración de la proteína de *M. haemolytica* para el serotipo A1 fué de 15.3436 µg / 10 µl y para A2 de 18.2125 µg /10 µl.

La concentración de proteína obtenida, fue la suficiente para la realización de las técnicas de ELISA-indirecta, electroforesis e inmunotransferencia; éstas 2 últimas a una concentración de 10 µg de proteína por carril.

### 6.2 Estandarización de la técnica de ELISA – indirecta.

Para ello, se realizaron diferentes diluciones de sueros controles positivos y negativos a *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2, así como el antígeno, con la finalidad de determinar las diluciones óptimas para la realización de la prueba.

Las diluciones fueron las siguientes:

Para los sueros: 1:20, 1:40 y 1:80.

Para el antígeno: 1:50, 1:100, 1:150 y 1:200.

En el caso del suero, la dilución óptima fue de 1:80; debido a que su Densidad Óptica (D.O.) fue de 0.340 nm siendo esta la más elevada con respecto a las demás diluciones. En cuanto al antígeno, la mayor D.O. alcanzada fue de 0.142 nm, misma que pertenecía a la dilución de 1:100.

### **6.3 Determinación de anticuerpos con las PME de *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2 en sueros de borregos vacunados.**

Los resultados obtenidos en la técnica de ELISA-indirecta para cada uno de los muestreos se observan más adelante en diversas gráficas; donde los animales vacunados mostraron una respuesta a la presencia del antígeno (PME del serotipo A1 de *Mannheimia haemolytica*); particularmente, los inoculados con el biológico "C" en el rancho 1; donde la mayor D.O. alcanzada fue de  $0.202 \pm$  nm. (Gráfico 1).

En el mismo gráfico, el biológico "C" muestra una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) tanto en el primer muestreo como en el segundo y cuarto en relación con los demás biológicos; en el tercer muestreo, la diferencia es poco significativa con los biológicos Experimental, Chino-in y Rodeo 9.

En el rancho 2 (Gráfico 2), el biológico One Shot mantuvo una diferencia significativa aún en el cuarto muestreo donde el título de anticuerpos generado por dicho inmunógeno decrece; ocurre lo contrario en el caso del biológico Chino-in, donde el reconocimiento de anticuerpos hacia las PME del serotipo A1 incrementó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en relación con los demás biológicos en el cuarto muestreo.

Para el caso del rancho 3, nuevamente el biológico One Shot muestra una elevada respuesta a éstos antígenos, misma que decae en el cuarto muestreo; caso contrario ocurre con el biológico Bact 3 que se mantiene constante hasta el cuarto muestreo, donde el título incrementa considerablemente, mostrando una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con los tres muestreos anteriores y con los demás biológicos. (Gráfico 3)

El grupo control en todos los casos no mostró cambios significativos; además de que su comportamiento fue similar para los tres ranchos.

En el caso del serotipo A2, solo en el rancho 1 muestra una elevada respuesta el biológico de One Shot, (Gráfico 5) con una D.O. de 0.532 nm y una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los demás biológicos empleados.

En el rancho 2, el biológico Rodeo 9 (Gráfico 6) se comportó de manera similar únicamente en el segundo muestreo con una D.O. de 0.715 nm; además de mostrar una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), cabe mencionar que después de dicho muestreo, bajó considerablemente el título de anticuerpos quedando incluso por debajo del biológico One Shot, el cual se mantiene de forma constante y con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en relación a los demás biológicos, aún cuando en el cuarto muestreo decae significativamente en el título de anticuerpos.

Para el caso del rancho 3 (Gráfico 7), los animales vacunados con el biológico Chino-in, son los que manifestaron mayor reconocimiento al antígeno. Cabe mencionar que los animales inoculados con el biológico One Shot inicialmente mostraron una respuesta satisfactoria, sin embargo, dicho título decae en los tres muestreos posteriores quedando incluso por debajo de los demás biológicos.

El grupo control se mantiene constante además de no mostrar cambios significativos.

En general, los animales vacunados con el biológico One Shot, muestran un comportamiento similar; manteniendo éste su respuesta a la presencia de PME de *M. haemolytica* por encima de los demás biológicos; dicho comportamiento se muestra tanto para el caso del serotipo A1 como para el del serotipo A2. (Gráficos 4 y 8)

Los grupos controles, para ambos casos, se mantienen constantes en todos los muestreos y por debajo de los grupos problema. (Gráficas 4 y 8)

#### **6.4 Reconocimiento de las PME de *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2 en borregas vacunadas, mediante la técnica de Inmunotransferencia.**

Para la realización de esta prueba, se eligieron los sueros cuya densidad óptica fue mayor en la técnica de ELISA; teniendo en consideración que dicha técnica es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes.

Se empleó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS para la separación de las proteínas, siendo éstas transferidas del gel a un papel de nitrocelulosa.

Las Figuras que a continuación se presentan, muestran el perfil de reconocimiento hacia las PME de *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2; en la Figura 1 se identifican dos proteínas principales de 123 y 49kDa, tanto para el serotipo A1 como para el A2; el biológico empleado en éste caso fue el A.

El reconocimiento hacia las PME en la Figura 2 y que difiere de los demás biológicos es para una proteína de 91 kDa, y únicamente se observa en el serotipo A1; en éste caso, el biológico que se administró fue Rodeo 9. Es importante señalar que el peso molecular (PM) de 49 kDa que muestra éste perfil fue encontrado también en los animales inoculados con el biológico Experimental, esto en el caso del serotipo A2.

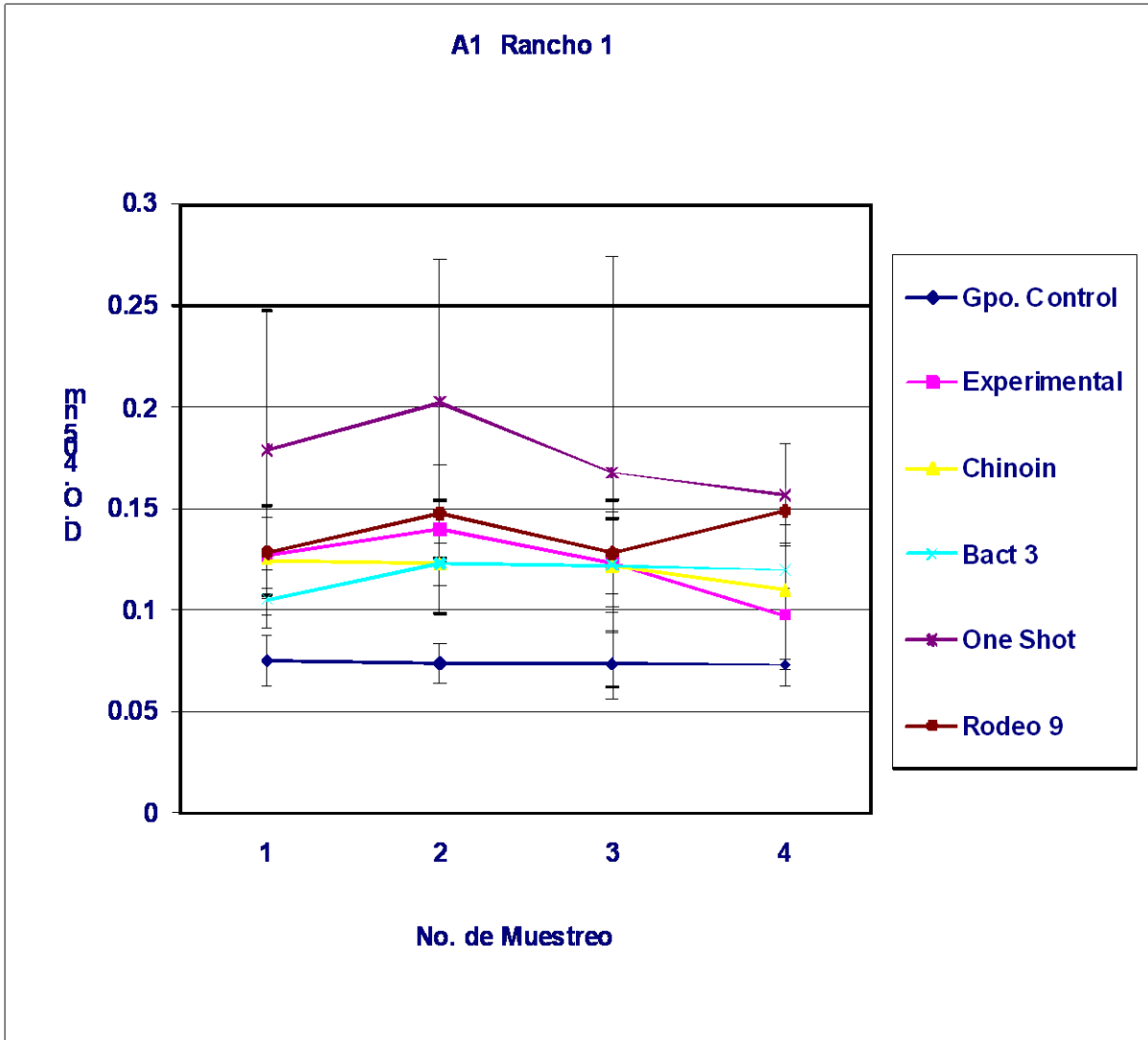
En este mismo caso, se muestra el reconocimiento hacia una proteína de 45 kDa en el serotipo A1, el cual no se repite en ningún otro caso.

En la Figura 3 se observan los resultados obtenidos en los animales vacunados con el biológico One Shot para el caso del serotipo A1 hay cuatro reconocimientos principales (123, 49 y 41 kDa); mientras que para el caso del A2 se pueden observar únicamente dos reconocimientos (123 y 49 kDa); éste último, coincide con el encontrado en el biológico One Shot con el antígeno del serotipo A1.

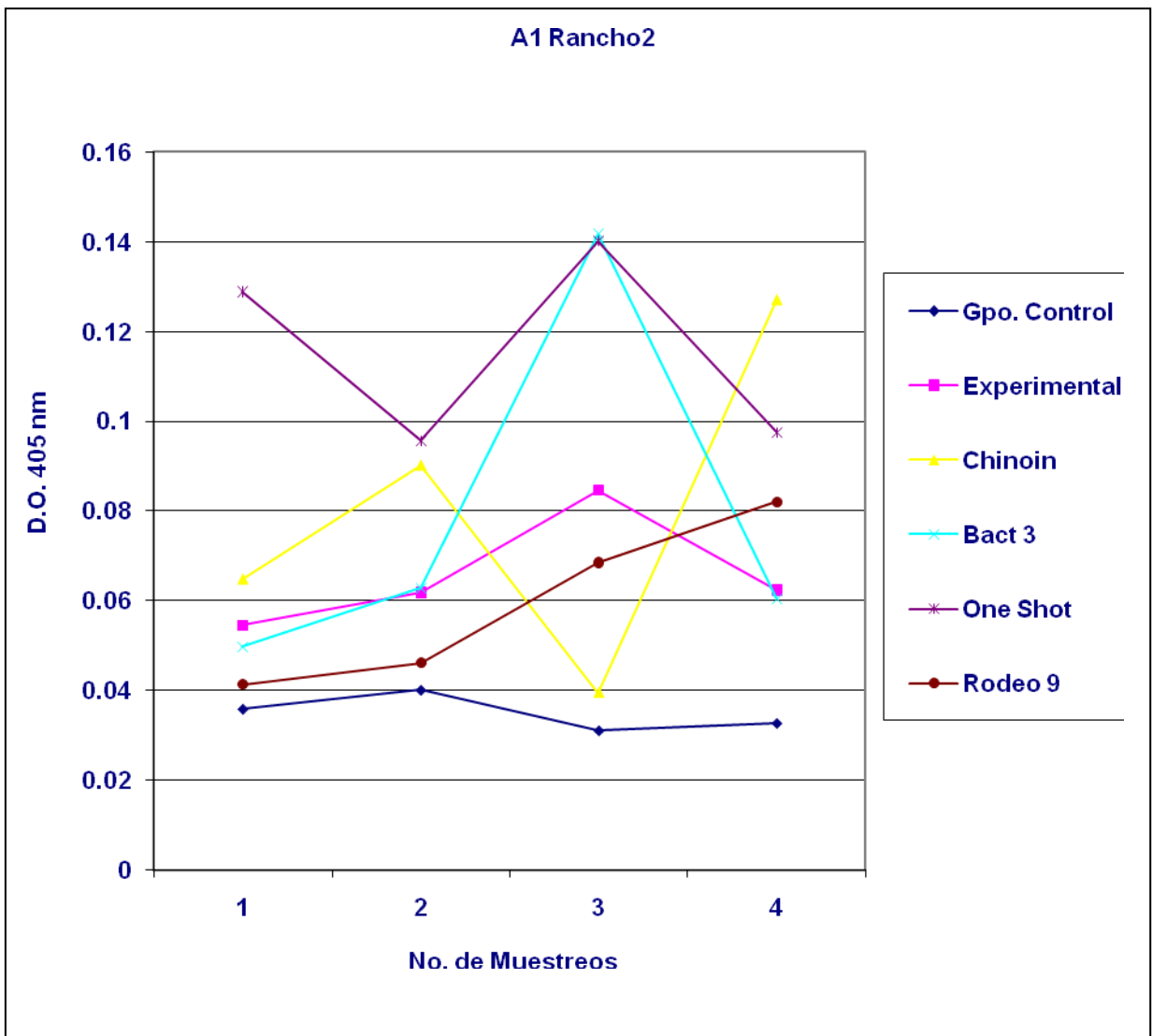
Cabe mencionar que los reconocimientos de menor PM difieren de los encontrados para ambos serotipos en los animales inoculados con los biológicos Experimental, Rodeo 9, y Chino-in; sin embargo, en el caso del biológico Bact 3, serotipo A2, hay similitud en una proteína de 19 kDa con el One Shot para el serotipo A2.

En el biológico Bact 3, (Figura 4) se observa una variación en cuanto al mayor PM de las proteínas reconocidas para el serotipo A2, el cual es de 114 kDa; éste reconocimiento no se repite en ninguno de los demás casos, incluso para el serotipo A1 del mismo biológico, donde el mayor PM fue el mismo que para los demás casos (123kDa).

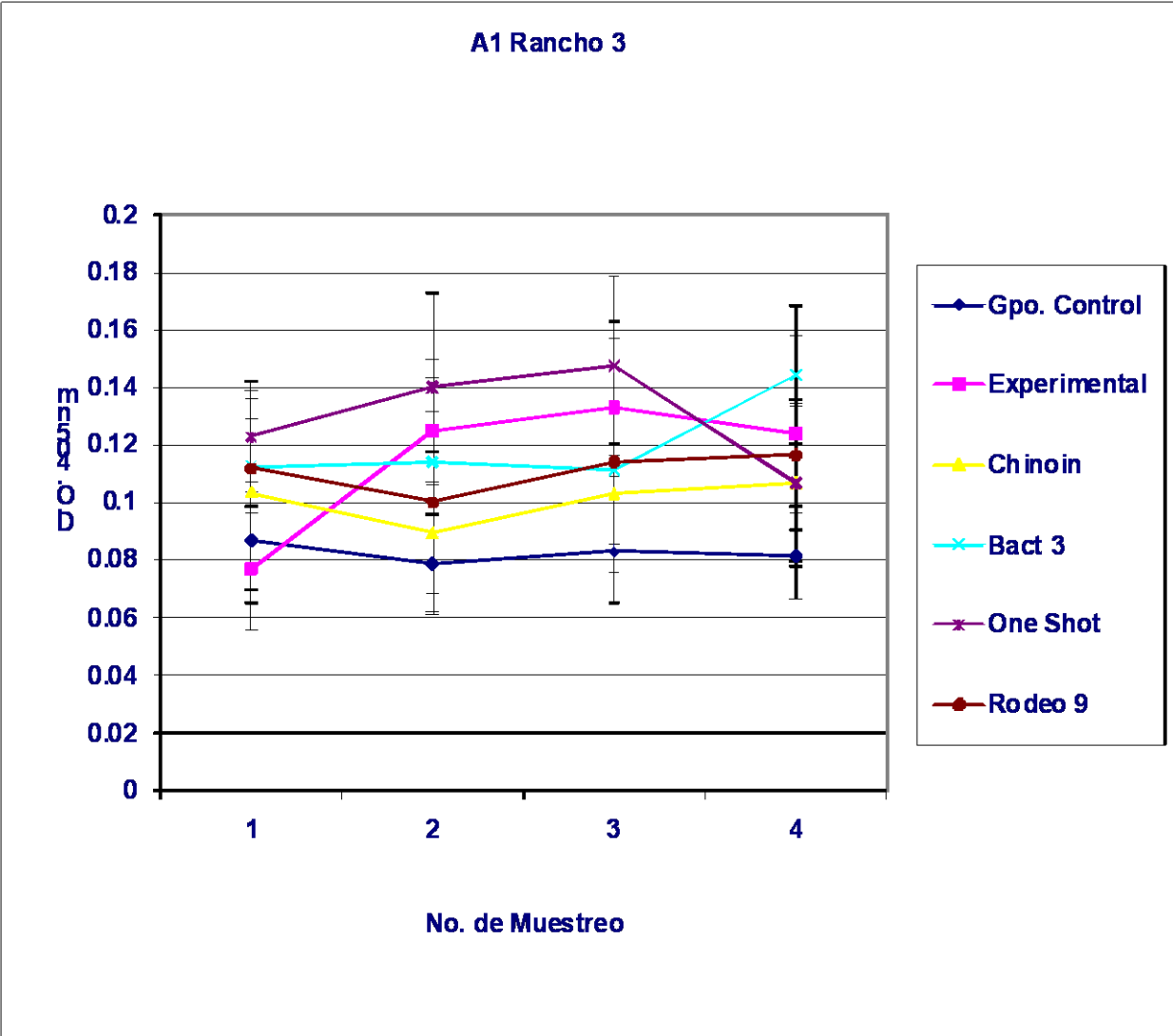
Finalmente, se muestra en la Figura 5 dos principales reconocimientos, (54 y 56 kDa para el serotipo A1 y A2 respectivamente) los cuales difieren de los encontrados en los demás biológicos.



Gráfica 1 Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados con 5 biológicos contra la Pasteurellosis neumónica a diferentes días post-inoculación. Los animales inoculados con el biológico "C" presentan mayor respuesta específica contra las Proteínas de Membrana Externa de *Mannheimia haemolytica* serotipo A1.

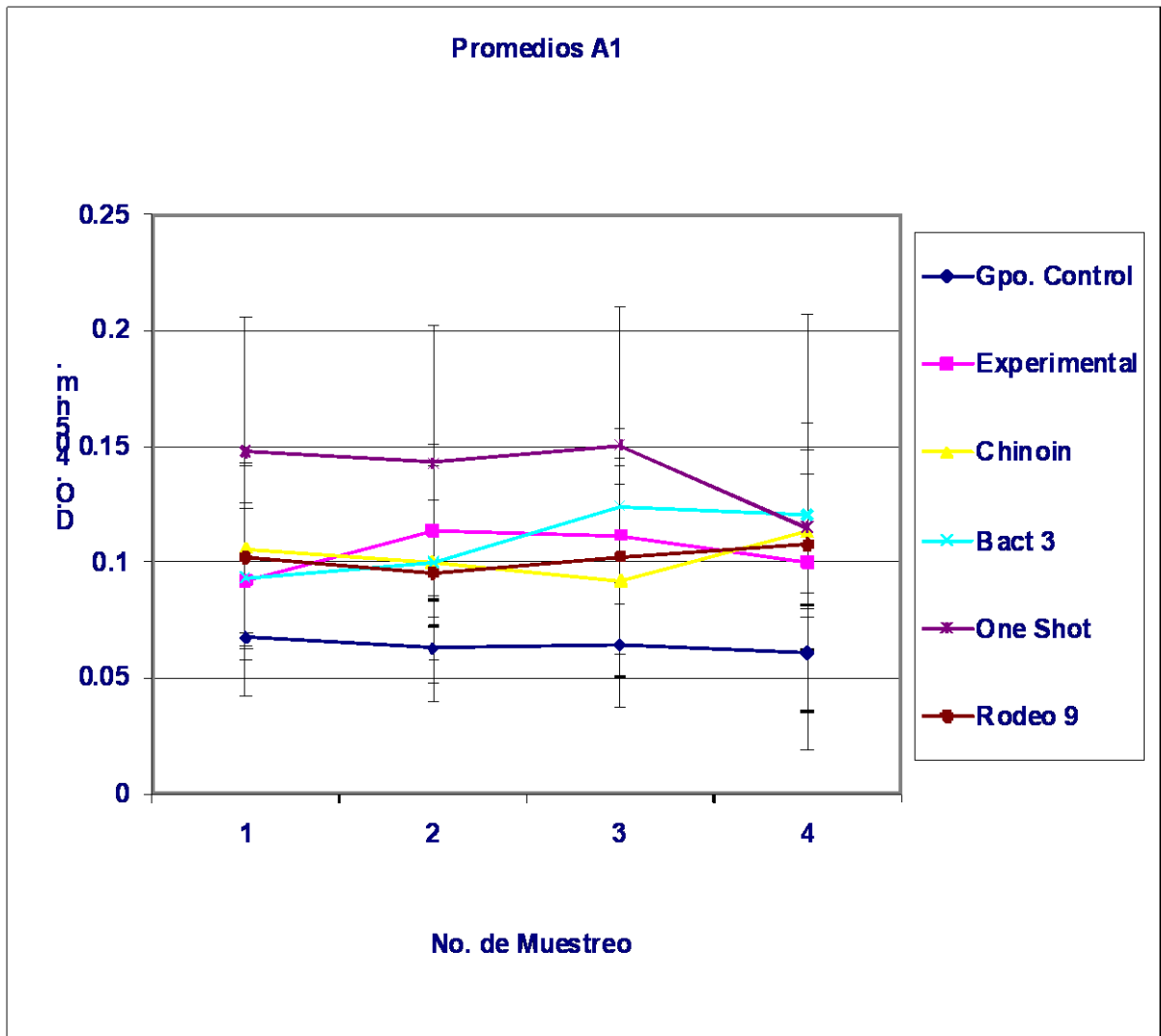


**Gráfica 2** Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados con 5 biológicos contra la Pasteurelisis neumónica a diferentes días post-inoculación. Los animales inoculados con el biológico “C” presentan mayor respuesta específica contra las Proteínas de Membrana Externa de *Mannheimia haemolytica* serotipo A1.

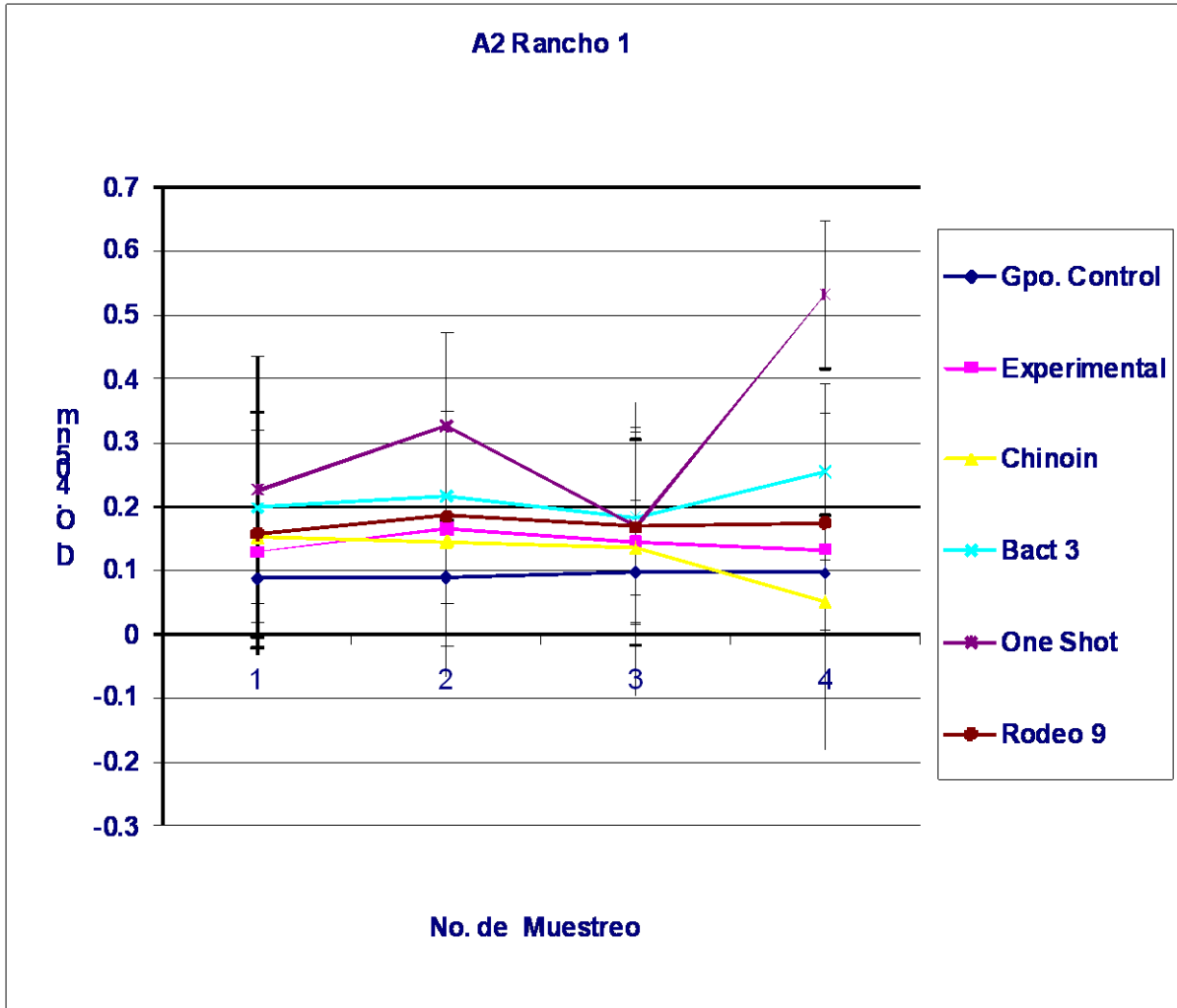


Gráfica 3 Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados con 5 biológicos contra la Pasteurelosis neumónica a diferentes días post-inoculación. Los animales inoculados con el biológico "C" presentan mayor respuesta específica contra las Proteínas de Membrana Externa de *Mannheimia haemolytica* serotipo A1.

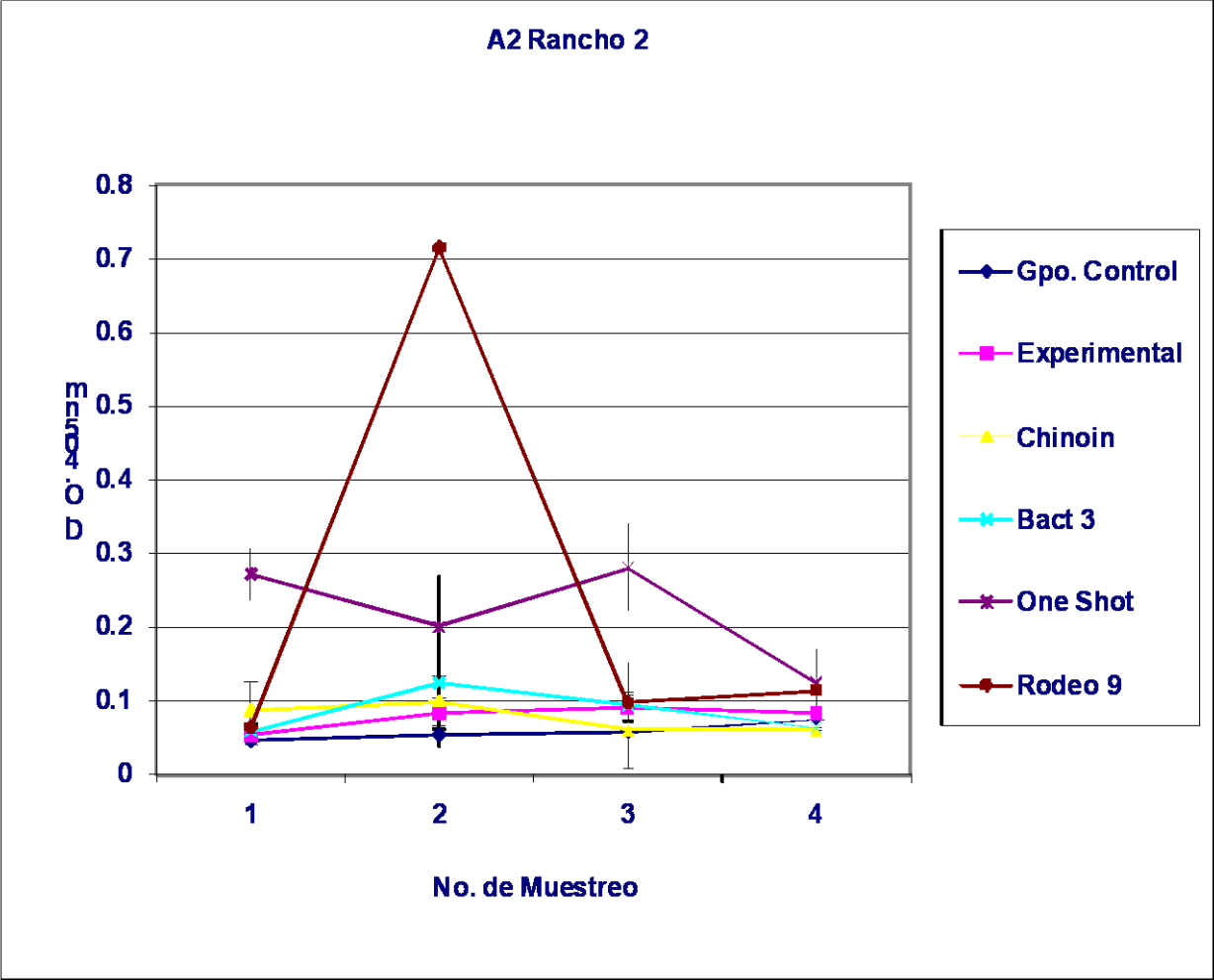




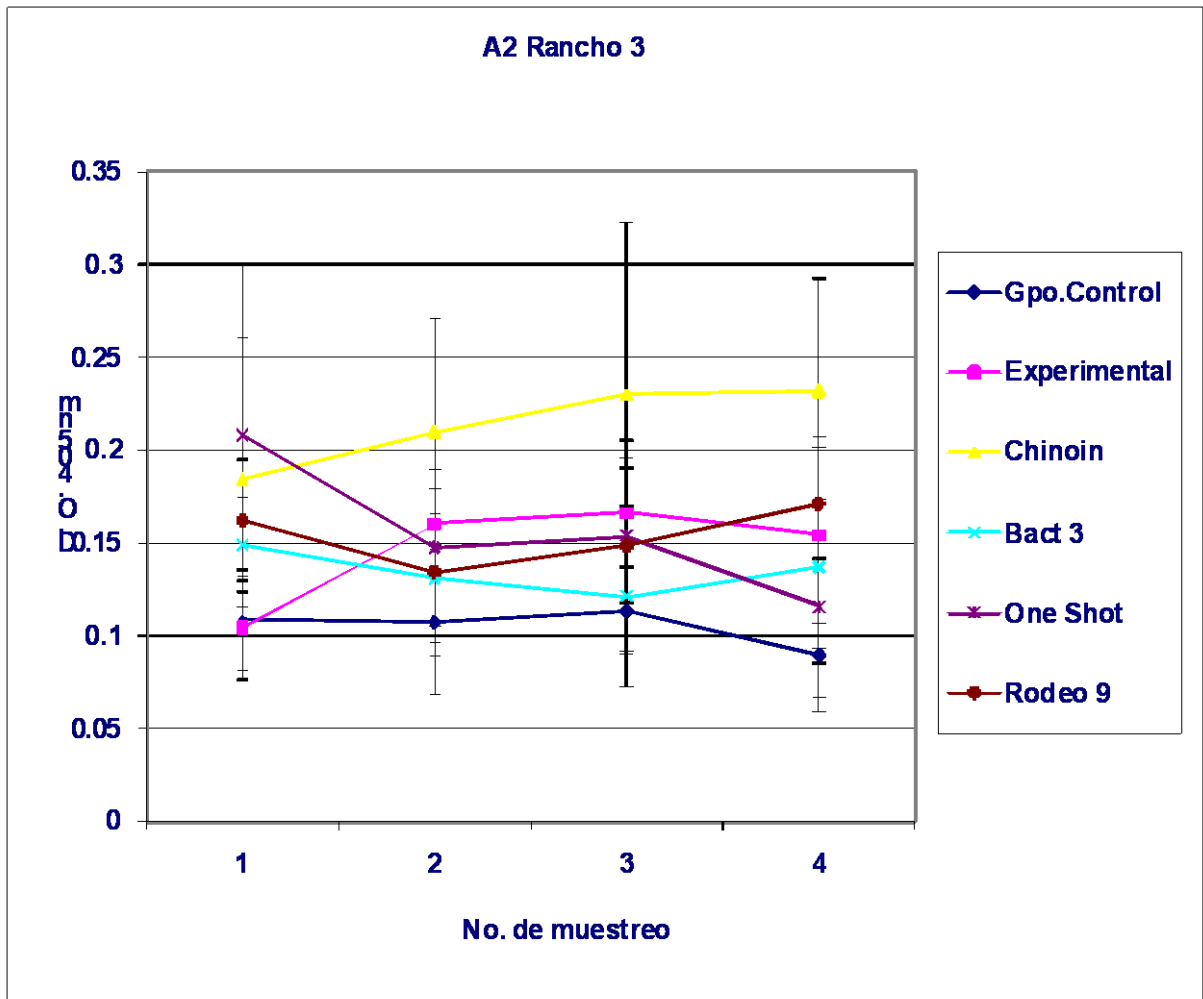
**Gráfica 4** Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados con 5 biológicos contra la Pasteurelosis neumónica a diferentes días post-inoculación. En general, los animales vacunados con el biológico “C”, muestran una respuesta elevada a la presencia de PME de *Mannheimia haemolytica*; mientras que el grupo control no muestra cambios significativos en ninguno de los muestreos.



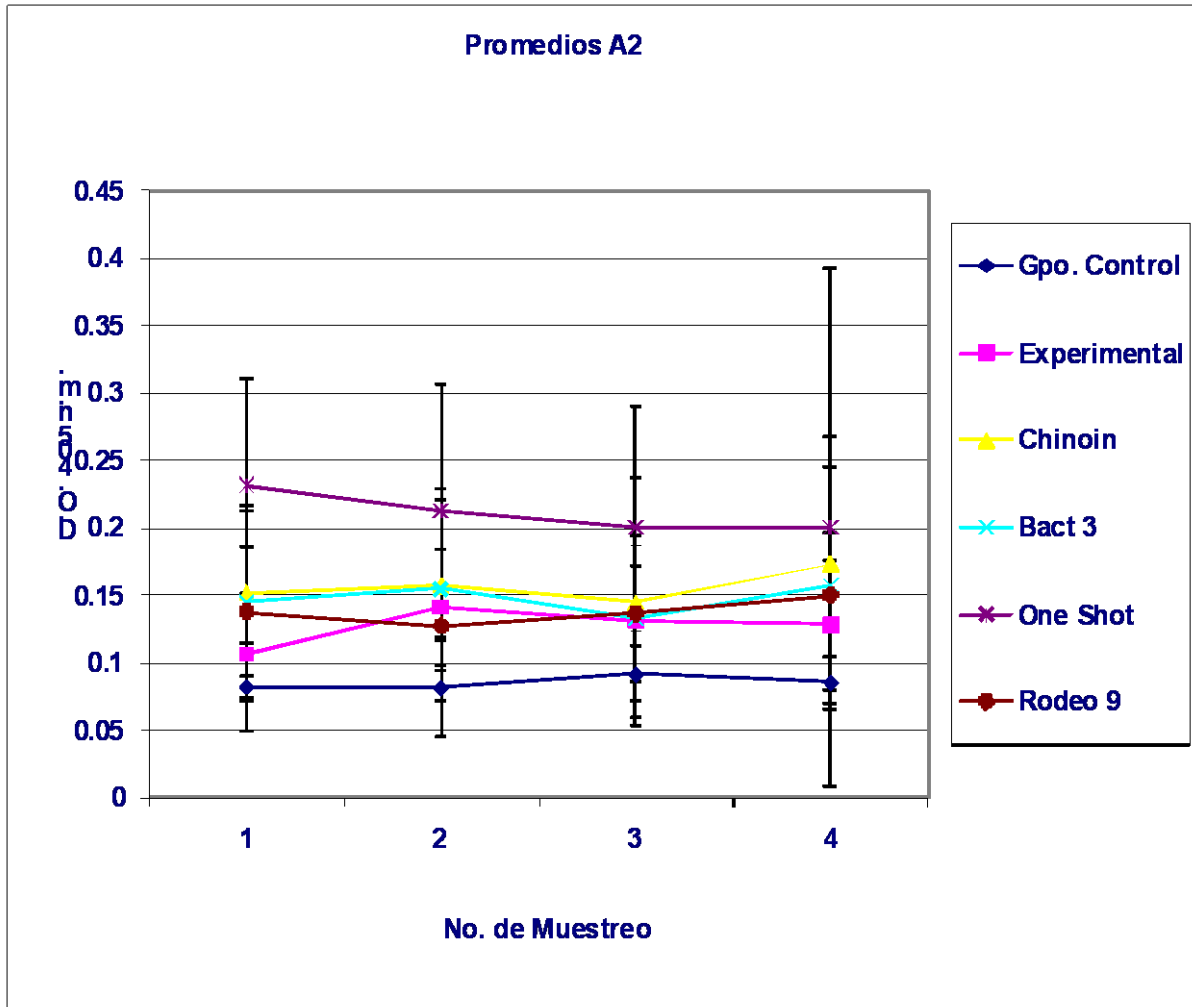
Gráfica 5 Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados con 5 biológicos contra la Pasteurelisis neumónica a diferentes días post-inoculación. Los animales inoculados con el biológico “C” presentan mayor respuesta específica contra las Proteínas de Membrana Externa de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2.



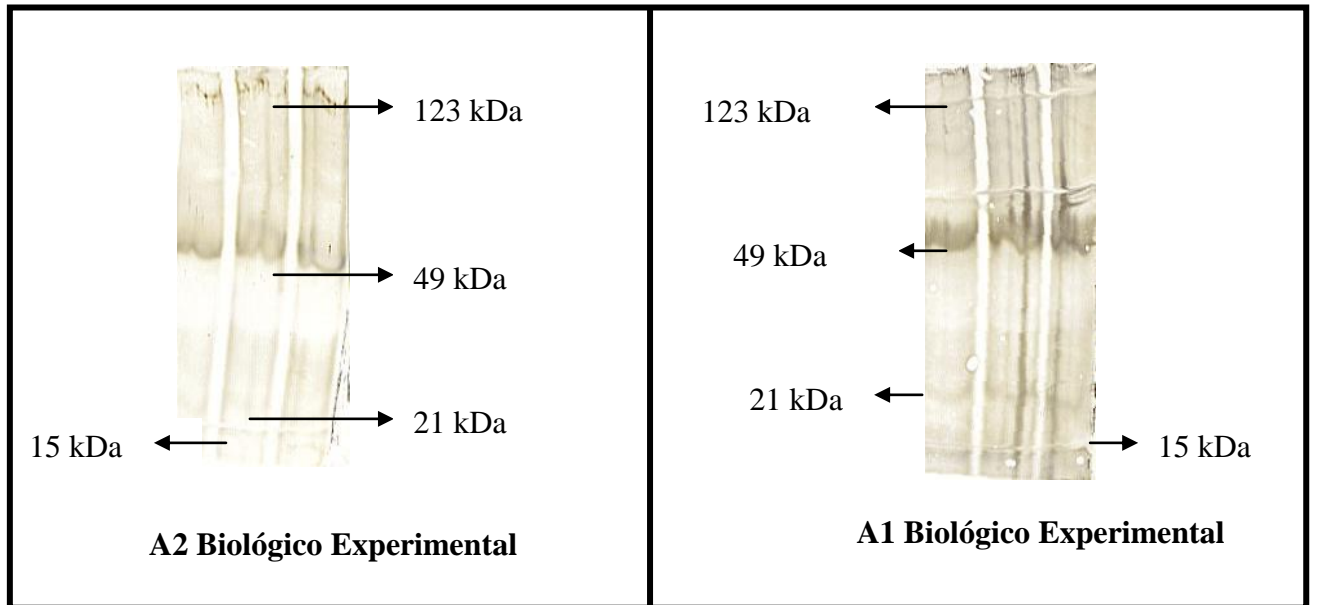
Gráfica 6 Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados con 5 biológicos contra la Pasteurellosis neumónica a diferentes días post-inoculación. Los animales inoculados con el biológico “B” presentan mayor respuesta específica contra las Proteínas de Membrana Externa de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 aunque con una variación muy marcada en el último muestreo, mientras que el biológico C presenta buena respuesta durante todos los muestreos.



**Gráfica 7** Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados con 5 biológicos contra la Pasteurellosis neumónica a diferentes días post-inoculación. Los animales inoculados con el biológico “E” presentan mayor respuesta específica contra las Proteínas de Membrana Externa de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2.



**Gráfica 8** Presencia de anticuerpos contra PME detectados por ELISA indirecta en ovinos inmunizados con 5 biológicos contra la Pasteurelisis neumónica a diferentes días post-inoculación. Para el caso del serotipo A2, los borregos vacunados con el biológico “C”, muestran mayor respuesta a la presencia de PME de *Mannheimia haemolytica* elevada durante los 4 muestreos en relación a los demás biológicos.



**Figura 1** Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico Experimental, utilizando las PME de *Mannheimia haemolytica* como antígeno. Se observa el perfil de reconocimiento hacia las PME de *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2; donde se identifican 2 proteínas principales de 123 y 49 kDa además de dos ligeros reconocimientos de bajo P.M (21 y 15 kDa).

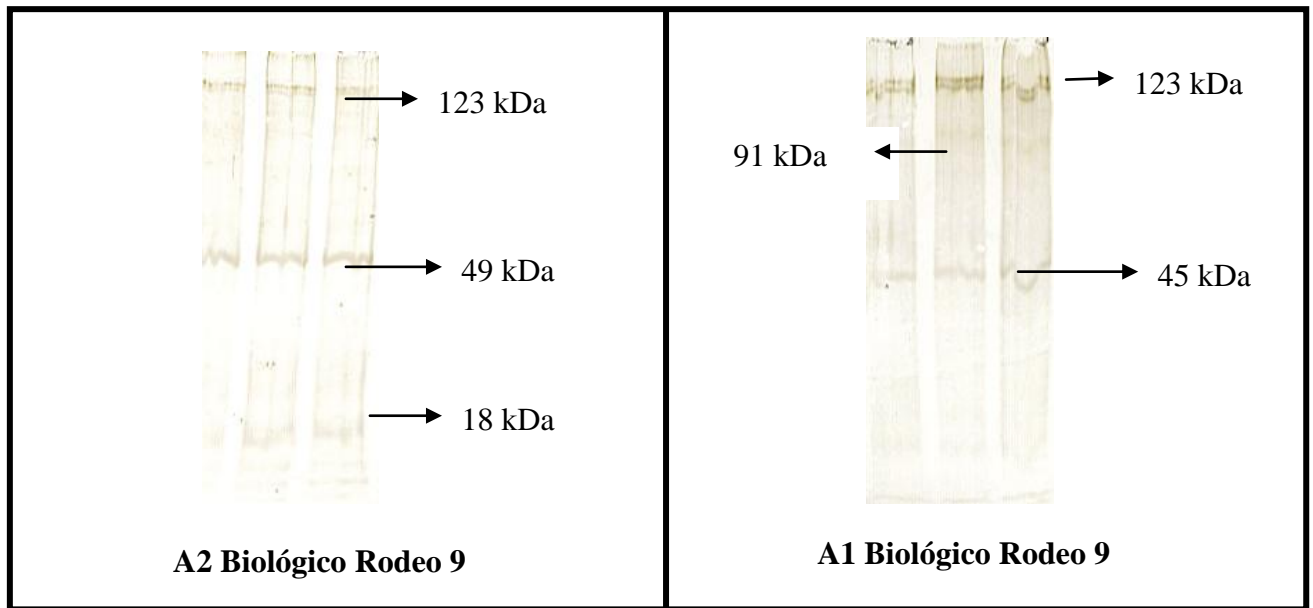
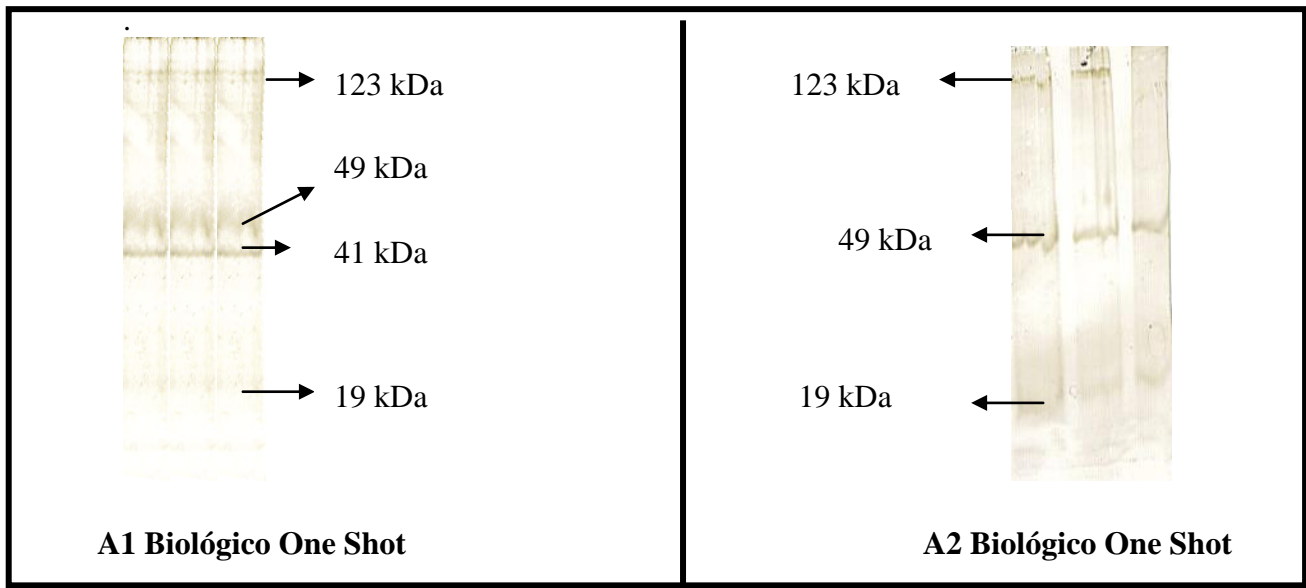
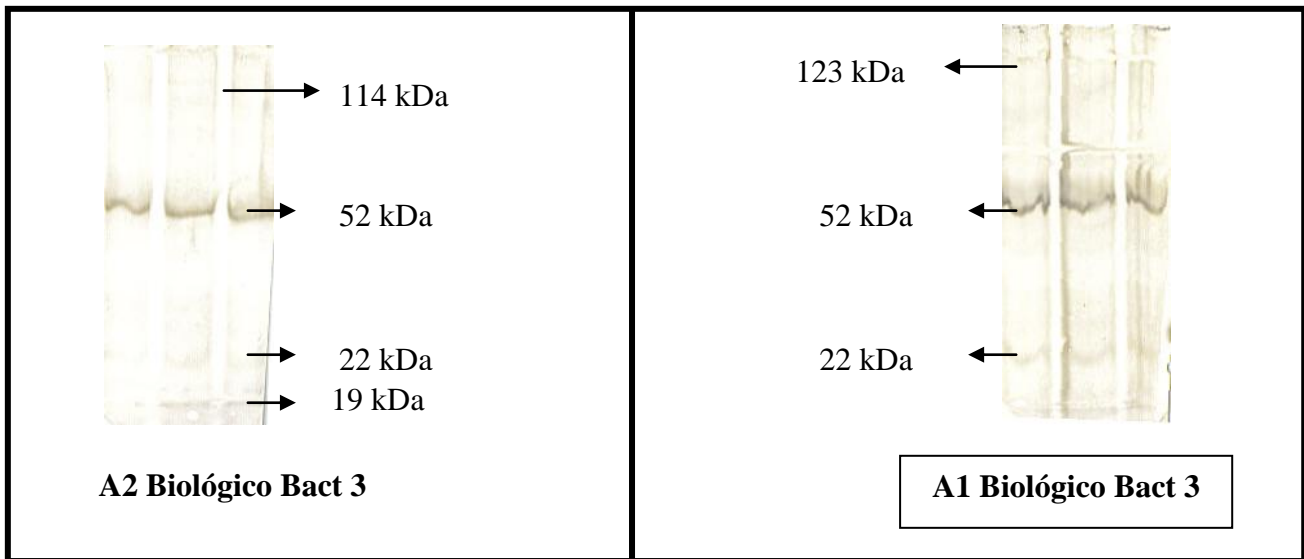


Figura 2 Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico Rodeo 9, utilizando las PME de *Mannheimia haemolytica* como antígeno. Se observa el perfil de reconocimiento hacia las PME de *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2; donde se identifican 3 proteínas principales de 123, 91 y 49 kDa además de dos ligeros reconocimientos de bajo PM (44 y 18 kDa).

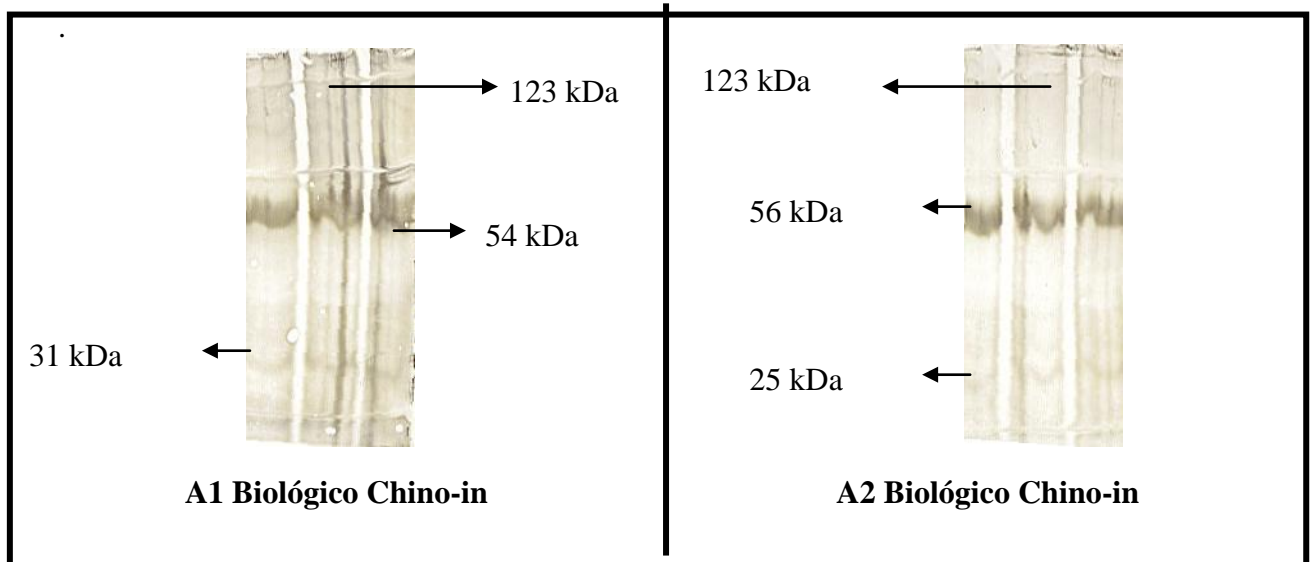


**Figura 3** Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico One Shot, utilizando las PME de *Mannheimia haemolytica* como antígeno. Se observa el perfil de reconocimiento hacia las PME de *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2; donde se identifican 3 proteínas principales de 123, 49 y 41 kDa además de un ligero reconocimiento de bajo P.M. (19 kDa).





**Figura 4. Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico Bact 3, utilizando las PME de *Mannheimia haemolytica* como antígeno. Se observa el perfil de reconocimiento hacia las PME de *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2; donde se identifican 3 proteínas principales de 123, 114 y 52 kDa, además de dos ligeros reconocimientos de bajo P. M. (22 y 19 kDa).**



**Figura 5** Inmunotransferencia de sueros de borregos vacunados con el biológico Chino-in, utilizando las PME de *Mannheimia haemolytica* como antígeno. Se observa el perfil de reconocimiento hacia las PME de *M. haemolytica* serotipos A1 y A2; donde se identifican 2 proteínas principales: 123 y 54 kDa para el serotipo A1; 123 y 56 kDa para el A2; además de observarse dos ligeros reconocimientos de bajo P. M. (31 y 25 kDa).

## 7. DISCUSIÓN

La extracción de PME en el presente trabajo se realizó con el método basado en la utilización de detergentes como la L- lauril Sarcosina, a través del cual se obtuvo cantidad suficiente para correr tanto la prueba de ELISA indirecta como para el Inmunoblot, lo que coincide con el trabajo realizado por Mc Vicker y Tabatabai (2002), quienes obtuvieron buen rendimiento de su antígeno usando la misma técnica.<sup>41</sup> Sin embargo, se han realizado diversos estudios donde se evalúan diferentes métodos para la obtención de PME; tal es el caso de Paravis *et al*, (1995) quien menciona dos métodos de obtención de proteínas: ultracentrifugación y autoclave a través de vapor fluente, obteniendo en ambos un buen rendimiento del antígeno para la realización de pruebas de inmunotransferencia.<sup>40</sup>

Por otra parte, Morton *et al*, (1996) menciona también que el método de Sarcosyl para la obtención de PME de *M. haemolytica* ha sido eficaz y menos laborioso que el de separación de membrana por sucrosa y centrifugación,<sup>42</sup> además, Mejía *et al*, (2004) menciona que la cantidad de proteínas de membrana externa que se utiliza para la elaboración de antígenos, depende en gran medida de la concentración de las mismas.<sup>43</sup>

La técnica de ELISA – indirecta arrojó resultados satisfactorios en éste trabajo debido a que hubo una clara detección de anticuerpos hacia las PME de *M. haemolytica*, lo cual coincide con varios autores quienes utilizan la prueba de ELISA para la detección de PME con diferentes agentes, entre los que destacan, *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, *A. pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* y la propia *Mannheimia haemolytica*<sup>39, 43, 47</sup>

El método de ELISA, a pesar de ser una prueba de gran utilidad para el diagnóstico, tiene su inconveniente en la dificultad de obtención de antígenos purificados y la posibilidad de tener reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas, como *Actinobacillus seminis*, *A. pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*; sin embargo, la utilización de otros antígenos, sobre

todo de naturaleza proteica, pueden ser una alternativa para contrarrestar estos efectos, como lo señala González (2002).<sup>44,45, 47</sup>

Además de las desventajas señaladas, la técnica de ELISA indirecta también tiene mayor costo y trabajo operacional (Mejía 2004); sin embargo, ya estandarizada la técnica y contando con los antígenos apropiados representa una alternativa útil para el diagnóstico de diversas enfermedades.<sup>43,46</sup>

Los resultados obtenidos en este trabajo con relación al análisis cualitativo de las proteínas en la inmunotransferencia, utilizando los sueros de los diferentes grupos de borregos vacunados, implicó el reconocimiento de una banda principal de 123 kDa presente en la mayoría de los animales vacunados con los diferentes biológicos, esta proteína no ha sido reportada en otros trabajos y por lo tanto se desconoce su implicación biológica. Sin embargo, González (2002) encontró proteínas con PM relativamente alto, entre 68 y 94 KDa; por otra parte, Mc Vicker y Tabatabai (2002) reportan cinco proteínas con pesos moleculares bajos de 42, 30, 24, 20 y 15 KDa, los cuales se aproximan a los encontrados en los animales vacunados con los biológicos One Shot (para los serotipos A1 y 2), Bac-3, (para el serotipo A2) y el de Chinoin (serotipo A1) cuyos pesos encontrados fueron de 41, 31, y 19 KDa.<sup>47,41</sup>

En 1999, Pandher *et. al*, determinaron la secuencia y caracterización del gen que codifica una PME de *M. haemolytica* S1 (nombrada P1pE) cuyo PM es de 45 KDa.<sup>31</sup> En el presente trabajo, el biológico Rodeo-9 serotipo A1 mostró un reconocimiento hacia una proteína con el mismo peso molecular referido. En 2007, Pandher *et. al*, demuestra que ésta proteína es genéticamente parecida a una lipoproteína (Om1A) de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos A1 y 5<sup>48</sup>; por lo que la actividad biológica de estas proteínas puede ser la misma.

Según estudios realizados por Ayalew *et al*, (2004) la mayoría de las moléculas de PME han jugado un papel importante en la inducción de respuestas inmunes protectoras y menciona también una PME de 45 KDa, la cual según sus estudios, genera una elevada respuesta de anticuerpos en animales que fueron desafiados experimentalmente; también demostró que las PME de *M. haemolytica* particularmente del serotipo A1 pueden ser buenos candidatos para la protección de las neumonías producidas por este microorganismo, ya que pueden conferir buena inmunidad.<sup>49</sup>

En éste estudio se encontró un alto reconocimiento hacia las PME de los serotipos A1 y A2, particularmente en aquellos biológicos donde se detectó la proteína de 123 KDa y cuyos casos fueron los biológicos Experimental, Rodeo 9, One Shot, y Chinoin; para el caso del biológico Bact-3, sólo en el serotipo A1 se observó dicho reconocimiento; lo que concuerda con lo demostrado por Ayalew *et al*, (2004).<sup>51</sup>

Cabe señalar que de los 5 biológicos empleados en este trabajo, sólo tres de ellos (One Shot, Experimental, Bac-3) se mantuvieron constantes con un buen título de anticuerpos, además de mostrar un buen reconocimiento hacia las PME como estructuras antigénicas; cabe mencionar que el biológico Experimental, fue desarrollado como producto de una línea de investigación en el INIFAP-CENID Microbiología y actualmente se ha estado probando en diferentes rebaños del país, mostrando buenos resultados al disminuir el porcentaje de mortandad en corderos cuyas madres fueron inmunizadas 15 días previos al parto. La protección conferida con este biológico se debe básicamente a la leucotoxina que contiene, sin descartar la participación de las PME contenidas en el mismo toxoide.<sup>52, 53, 54, 55, 56.</sup> ,

Por otra parte, pese a que hubo un amplio reconocimiento de anticuerpos contra las PME de *M. haemolytica* A1 por parte de la bacterina-toxoide de One Shot, es importante señalar que este biológico, únicamente está hecho a base de cultivos completos de éste microorganismo, específicamente del serotipo A1; lo que podría explicar la disminución en el título de anticuerpos que mostró en algunos casos, particularmente en el grupo

de animales donde se evaluó el serotipo A2, concretamente los del Rancho 3 (Gráfica 7).

También es importante señalar las indicaciones de cada laboratorio productor para la administración de éstos biológicos: en el caso de One Shot, se administran 2.0 ml por vía SC, por lo menos 10 días antes del destete y, según indicaciones, no es necesario una revacunación a menos que el animal sea sometido a situaciones de estrés. Para el caso del biológico experimental, la opción es 15 días previos al parto y posteriormente a los dos meses de edad del cordero nacido de la madre inmunizada, sin necesidad de revacunación, la dosis empleada es también de 2ml. Otro ejemplo es con el biológico Rodeo 9, que recomienda administrarse a los 2 meses de edad, con una revacunación a los 30 días y, posteriormente cada 6 o 12 meses; como se puede observar, el uso de uno u otro biológico queda a criterio del productor; aunque lo más recomendado es que sea poco el gasto y mucho el beneficio y entre mayor sea el número de revacunaciones, mayor será la inversión, además, cabe señalar que etológicamente hablando, los ovinos tienden a ser más susceptibles al estrés.

En cuanto a los demás biológicos, es probable que el pobre reconocimiento hacia estas proteínas y la baja respuesta de anticuerpos hacia las mismas, se deba a que las condiciones de cultivo para la preparación de las vacunas no sea el propicio para que éstas lleguen a la fase logarítmica de crecimiento, misma que es necesaria para la producción de leucotoxina y de otros componentes de membrana que han sido involucrados en el desarrollo del cuadro neumónico en ovinos; también es importante mencionar que estos biológicos fueron diseñados para la protección de neumonías en bovinos, por lo que además de lo ya mencionado, el serotipo empleado para estos productos es el "A1", que es el más común en bovinos.

Por otra parte, la inmunización ha tenido un impacto importante en reducir pérdidas económicas debido a las enfermedades infecciosas tales como las neumonías y la disponibilidad de diversos inmunógenos está

proporcionando la oportunidad de prevenir este tipo de problemas en grupos de edades diferentes y reducir así la morbilidad y mortalidad.<sup>50</sup>

Recientemente se han desarrollado una diversidad de inmunógenos para prevenir la neumonía por *M. haemolytica*, con resultados aparentemente satisfactorios en algunos casos; por ejemplo con los que mejores resultados se han obtenido son los inmunógenos creados a partir de cultivos jóvenes, los cuales producen más material inmunogénico (material capsular y leucotoxina)<sup>50</sup>

En algunos trabajos se ha reportado cierto grado de protección con el uso de bacterinas y otros extractos, lo que sugiere que otros antígenos, además de la LKT, pueden considerarse importantes para conferir protección contra la pasteurelisis neumónica; tal es el caso de las PME.<sup>37</sup>

En la actualidad se han realizado diversos estudios con PME de diferentes géneros bacterianos, un ejemplo de ellos es *Brucella spp.*. Chávez (2004) concluye que las PME pueden ser buenas candidatas para la elaboración de inmunógenos contra la brucelosis ovina. Cuevas (2006), realizó una evaluación de éstas estructuras, demostrando su importancia y dando pie a su posible utilidad para la creación de nuevas vacunas para la prevención de la brucelosis en México.<sup>38, 39</sup>

Sin embargo, es necesario realizar estudios subsecuentes que incluyan el desafío de animales en condiciones controladas, para determinar la participación de las PME en la protección específica contra la pasteurelisis neumónica.

## 8. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de anticuerpos contra las PME de *M. haemolytica* mediante las técnicas de ELISA – Indirecta e Inmunoblot; tanto para el serotipo A1 como para el serotipo A2; particularmente hacia las proteínas de 123, 114.y 45 kDa en el suero de los corderos vacunados; por lo que este tipo de antígenos resultarían ser buenos candidatos para la elaboración de biológicos que protejan contra las neumonías en borregos.
- La proteína con el mayor reconocimiento en animales inmunizados fue la de 123 KDa.
- El método de extracción de PME de *Mannheimia haemolytica* utilizado, permitió obtener tanto cantidad como calidad suficientes para el análisis cualitativo y cuantitativo de éstas estructuras antigénicas en la evaluación de la respuesta inmune en corderos vacunados, por lo que se recomienda el uso de ésta técnica para la obtención de PME como antígenos para las técnicas de ELISA e Inmunoblot.
- El biológico que indujo el mejor reconocimiento de PME en ovinos vacunados fue el que pertenece al laboratorio Pfizer ( “One Shot”) y el desarrollado en el CENID-Microbiología.



## 9. LITERATURA CITADA

1. Aley MR y Clarke JL. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. N Z Vet J. 1977:25-200
2. Martínez BJ., Efectos adversos sobre los mecanismos de depuración pulmonar del tracto respiratorio y su relación con Pasteurellosis Neumónica; Monterrey, Nuevo León., México., Memorias del Seminario sobre Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino, 1995, p. 10.
3. Pulido F. M. Jaramillo M. L. Trigo T. J. F. Aguilar R. F. Efecto potencial de diferentes adyuvantes en la respuesta inmune inducida por la administración de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*. A1 en conejos. Vet. Méx. XXII: 4: 407-413,1991.
4. Confer AW, Panciera RJ, Gentry MJ, Fulton RW. Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 1986; 47:1853. )
5. Monterrey, Nuevo León., México., Memorias del Seminario sobre Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino, p. 10.).
6. Wodcock. J. B. Infección Bacteriana e Inmunidad de los Animales domésticos. Edit. Acribia. España 1984.
7. Highlander S.K. Molecular genetic análisis of verulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. (Baylor Colege of Medicine, Department of Molecular Virology and Microbiology, One Baylor, MS BCM280, Houston, Tx 77030, USA.
8. Dereck AM, Simons KR, Confer AW, Panciera RJ y Clinkenbeard KD. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infect Immun. 1989; 57: 711-716.

9. Jacques N. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Editorial Acribia. España 1986.
10. Parameshwar J. M., Murphy G. L., Wyckoff III J. H., Farmer S., Hancock R. E. W. and Confer A. W.. Purification and Partial Characterization of the OmpA Family of Proteins of *Pasteurella haemolytica*. Infection and Immunity. 1997. 211-218.
11. Davies R. L. and Lee I. Sequence Diversity and Molecular Evolution of the Heat-Modifiable Outer Membrane Protein Gene (ompA) of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. J. Of Bacteriology. 186 (17) 5741-5752.
12. Ramírez R. R. y Brogden. K. A. Patogénesis del daño pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*. 1995 Rev. Lat- AMER. Microbiol. 37: 353-365 .
13. Smith G. R. Isolation of two types of *Pasteurella haemolytica* from sheep. Nature. 1959; 183:1132-1133.
14. P. J. Blackall. M. Bisgaard y C. P. Stephens. Phenotypic characterisation of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varugena*. 2002. Aust. Vet. J. 80 (1-2)
15. Morales, A.J.F.,. Evaluación experimental y en campo de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. Tesis para Maestría en Producción Animal. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM 1991.
16. Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE y Bisgaard M.. Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of

- Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov., and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999; 49: 67-86.
17. Morales, A.J.F. Avances y perspectivas sobre inmunización contra la pasteurelosis neumónica en ovinos. Resúmenes del simposium de Inmunología del Aparato Respiratorio, Editado por Aguilera FJL. et al. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.
  18. Jean, Y. H. and Bak, U. B. Pathological studies on the calf pneumonia experimentally induced by endotoxin and leucotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1. J. Agric. Sci. Vet., 1953, 35: 643-658.
  19. Markham, R. J. and Wilkie, B. N. Interaction between *Pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages. Cytotoxic effect on macrophage and impaired phagocytosis. Am. J. Vet. Res. 1980, 41: 10-22.
  20. Burrows, L. L., Olah- Windfield, E. and Lo, R. Y. C. Molecular analysis of Leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Infect. Immun. 1993, 61: 5001-5007.
  21. Sutherland AD, Donachie W. Cytotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet. Microbiol. 1986; 11: 331.
  22. Briggs RE y Frank GH. 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; 1992, **53**:631-635.
  23. Abdullah KM, Udoh EA, Shewen PE y Mellors A. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. Infect. Immun. 1992, 60:56-62.

24. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all theories are correct. *Glycobiology* 1993, 3, 97-130
25. Friend, SCE, Wilkie, BN, Thomsom, RG, y Barnum DA. Bovine pneumonic pasteurellosis experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. *Vet. J.* 1997, 41:77-83 .
26. Marchart J, Dropmann G, Lechleitner S, Wanner G, Szostak M.P and Lubitz W. *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*-ghosts: new vaccine candidates. 2003 *Vaccine* 21 3988-3997.
27. Confer AW, Panciera RJ, Corsvet RE, Rummage JA, and Fulton RW. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45: 2543-2543.
28. Morales A. J. F. y Martínez M, O. L., El uso de inmunógenos para la prevención de neumonías en ovinos, Memorias del Curso de Bases de la Cría Ovina. 2002.
29. Bowersock, T. L., Shalaby, W. S., Levy, M. Samuels, M. L., Lallone, J. R. White, R. M., Borie, D. L., Lehmeyer, J. and Park, K. Evaluation of an orally administered vaccine using hydrogels containing bacterial exotoxins of *Pasteurella haemolytica* in cattle. *Am, J. Vet. Res.*, 1994, 55:502-509.
30. Aguilar R. F., Jaramillo M. I., Morales A. J. F., Trigo T. J. F., Suárez G. F. Evaluación de la protección contra la pasteurellosis neumónica, en corderos vacunados con diferentes antígenos de A1. *vet. Méx.* 1997, 28 (3).
31. Pandher K., Murphy, G. L. and Confer A. W. Identification of immunogenic, surface-exposed outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Vet. Microbiol.* 1999. 65(3):215-226.

32. Cloeckaert A, Verger J. M, Grayon M, and Vizcaino N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *Microbiol.* 1996;145:1-8..
33. Cloeckaert A, Tibor A, and Zygmunt M.S. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin. Diagn. Lab. Immuno.* 1999;6:627-629.
34. Abbas, AK, Lichtman, AH y Pober, JS: Inmunología Celular y Molecular. 4ª ed. Edit. McGraw-Hill-Interamericana. España. 2001;541-543.
35. Crespo, LF. Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties, Murcia, España. 1994.
36. Verstrete DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, and Winter AJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus* isolation and characterization. *Infect. Immun.* 1982; 35:979.
37. Shewen, P.E. y Wilkie, B.N., *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by typespecific rabbit antisera, *Am. J. Vet. Res.*, 44:715;
38. Chávez C.A.. “Elaboración de un inmunógeno de Membrana Externa de *B. ovis* utilizando ADN como adyuvante y su evaluación en un sistema Murino” Tesis para Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. 2004.
39. Cuevas, P.A.. “Respuesta Serológica Contra las Proteínas de Membrana Externa de la Cepa RB51 de *B. abortus* en Borregas Vacunadas”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. 2005.

40. Paravis M.S. Muller G, Rossi S, Tonna H, Silvera V y Carreto L. *Brucella ovis*. Desarrollo de una técnica de ELISA para Diagnóstico Serológico en Uruguay. Rev. Latamer. Peq. Rumiantes. 1995; 1(3):197.
41. Mc Vicker, J.K. y Tabatabai LB; "Solation of immunogenic outer membrane proteins from *Mannheimia haemolytica* Serotype 1 by use of selective extraction and immunoafinity chromatography. Am. J Vet Res. 2002, 63(12): 1634-1640.
42. Morton, RJ, Simons, KR y Confer Aw. Major Outer Membrane Proteins of *Pasteurella haemolytica* Serovars 1-15: Comparison of Separation Techniques and Surface-exposed Proteins on Selected Serovars. Vet Microbiol 1996. Aug; 51(3-4):319-330.
43. Mejía, SP, Díaz, AE, Salas, TE y Tenorio GRV. "Identificación de las Proteínas de 35 y 38 kDa Específicas de *Brucella ovis*. Téc. Pecu. Méx 2004; 42(2):277-285.
44. Nielsen, K. The Serological Response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* 0.9 or to *Yersinia and Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassay, Vet. Immunol. Immunopatol. 1990; 24(4):373-382.
45. Candelo A, Benavides A, Arriojas L, Huerta J, Marcano M, Meléndez G. Determinación de la Inmunidad Humoral en Bovinos Vacunados con la Vacuna Antibrucella RB51, utilizando la Técnica de Western – Blot. Vet. Tropical. 2001; 26(2): 1-4.
46. Montaña SN, Rueda LOE, Calderón PCP Ortega A, Fuetes AR, Gallego MMI, Mariño JOC. "Medición de la Respuesta Inmune Humoral y Celular Frente Antígenos de *Brucella abortus* RB51 en Bovinos". Arch. Med. Vet. 1998;30(2)109-123.

47. González RC. "Perfil Serológico contra Antígenos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en Corderos Clínicamente Enfermos de Neumonía y Desafiados Experimentalmente" Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. 2002
48. Pandher K, Murphy GL y Confer AW Identification of immunogenic, surface-exposed Outer Membrane Proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1 Department of Anatomy, Patology and Farmacology, College of Veterinary Medicine, Oklahoma State University, Stillwater 74078-2007. USA.
49. Ayalew S., Anthony W., Confer AW. y Emily R. Characterization of Immunodominant and Potentially Protective Epitopes of *Mannheimia haemolytica* Serotype 1 Outer Membrane Lipoprotein PlpE. Infect Immun. 2004. 72(12):7265-7274.
50. Morales, A. J. F. "Neumonía en ovinos causada por *Mannheimia haemolytica*" Memorias del Foro Ovino Metepec, Edo. de Méx. 2007.
51. NORMA Oficial Mexicana NOM-049-ZOO-1995. Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la pasteurelisis neumónica bovina producida por *Pasteurella multocida* serotipos A y D.
52. Ortega F. D., Tovar L. G. V., "Respuesta Serológica a Cuatro Biológicos Comerciales y uno Experimental utilizados para Prevenir la Pasteurelisis Neumónica en Ovinos". Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 2005.
53. Morales AJF, Aguilar RF y Zenteno RG. Prevención de la neumonía fibrinosa en ovinos causada por *Mannheimia haemolytica* utilizando un nuevo biológico desarrollado en el CENID-Microbiología Animal. Desplegable Informativo no 9. CENID-Microbiología INIFAP. 2007.

54. Téllez LI y Salazar L. Evaluación de una vacuna comercial y una experimental contra la pasteurelosis neumónica en ovinos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 2000. Director de tesis. Morales AJF y Cuéllar OJA.
55. 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 Pasteurelosis Neumónica en ovinos. IV Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Curitiba, Brasil. 2005.
56. Ramirez CG. Evaluación de la respuesta inmune a tres dosis de bacterina toxoide contra *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en ganado ovino de la raza Suffolk en el municipio de Tlaxco, Estado de Tlaxcala. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2003.



## APÉNDICE

### 1. MEDIO Y AGAR BACTERIOLÓGICO.

#### 1.1 Preparación del medio y agar bacteriológico.

Medio Infusión Cerebro Corazón (BHI)-----36g  
Agar bacteriológico -----15g  
Agua destilada-----1000ml

El medio BHI y el agar bacteriológico se disuelven en 1000ml de agua destilada; una vez disuelto mediante ebullición, se esteriliza en autoclave (120°C a una atmósfera, durante 20 minutos); ya esterilizado se sirve en cajas de Petri procurando un grosor no mayor de 5ml del medio y así facilitar su pronta y eficaz gelificación (lo óptimo es obtener entre 35 y 40 placas por litro de medio).

### APÉNDICE 2. TINCIÓN DE GRAM. (Técnica)

- Cristal Violeta 1 minuto
- Lavado
- Lugol 1 minuto
- Lavado
- Alcohol – Acetona
- Lavado
- Zafranina 1 minuto
- Lavado

### APÉNDICE 3. REACTIVOS DE ELISA

#### 3.1 TRIS ELISA buffer pH 7.4

Cloruro de sodio (NaCl)----- 8.7 g  
Tris base -----6.05 g

Disolver en 850 ml de agua destilada.

Ajustar pH 7.4 agregando ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio al 5M(NaOH) según sea el caso.

Agregue agua destilada cbp 1000 ml.

Poner 1 g de albúmina de bovino, sobre la solución y deje reposar por 15 minutos.

Agite despacio hasta que la albúmina se disuelva.

Agregue 0.5 ml de Tween 20 y mezcle bien.

### **3.2 Indicador de color ABTS**

ABTS ----- 0.27335 g

Agua destilada----- 12.5 ml.

### **3.3 Solución buferada de Carbonato – Bicarbonato pH 9.6**

Bicarbonato de sodio (Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> ) ----- 1.6g

Carbonato de sodio (Na HCO<sub>3</sub> ) ----- 2.9 g

Agua destilada ----- 1000 ml.

Ajustar a pH 9.6 con Hidróxido de sodio (NaOH ) al 5 M o con HCL según sea el caso.

### **3.4 Solución de lavado (Wash)**

Cloruro de sodio (NaCl) ----- 8.5 g

Agua destilada ----- 1000 ml.

Tween 20 ----- 0.5 ml.

### **3.5 Solución de parado (STOP)**

Ácido sulfúrico al 3M

### **3.6 Buffer Acido cítrico pH 4.0 (Substrato)**

Ácido cítrico ----- 9.6 g

Agua destilada ----- 1000 ml.

Ajustar a pH 4.0 con NaOH al 1 M.

### **3.7 Peroxido de hidrógeno**

Agua destilada ----- 7.5ml.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% ----- 0.5 ml.

La solución substrato de ABTS para una microplaca se hace de la siguiente manera:

Buffer Ac. Cítrico ----- 10 ml.

Solución ABTS .----- 0.1 ml.

Peróxido de Hidrógeno .----- 0.08 ml.

Mezclar antes de usarse, agregar 100 µl por pozo.

NOTA: La cantidad total de ésta solución se hace en base al número de placas que se vayan a correr.

## APÉNDICE 4. ELECTROFORESIS

### **4.1 Elaboración de geles para electroforesis.**

Resolving buffer ----- 5.7 ml  
Acrilamida 30% ----- 3.3 ml.  
Persulfato de Amonio 0.9% --- 50µl  
TEMED -----10 µl

### **4.2 Buffer de corrida.**

TRIS 1.5 M (pH 8.8).----- .10 ml.  
SDS 10% ----- .0.4 ml.  
Agua destilada ----- .12.4 ml.

### **4.3 Buffer de muestra.**

Tris 0.5 M pH 6.5 ----- 3 ml.  
EDTA 0.2 M.----- .0.3 ml.  
SDS 10% ----- 3 ml.  
2- Mercaptoetanol.----- .0.3 ml.  
Glicerol.----- .2.4 ml.  
Agua destilada ----- .3 ml.

## APÉNDICE 5. INMUNOBLOT

### **5.1 Buffer de transferencia**

25 mM Tris  
192 mM Glicina pH 8.3  
20% metanol  
0.05-0.01 SDS  
(20mM, Tris-HCL [ pH 8.3 ], 192 mM glicina).

### **5.2 5X Buffer SDS-page**

Tris-Base.----- 15 g  
Glicina.----- 72g  
SDS ----- 5g  
Disolver en 900ml de agua destilada y ajustar a 1000ml, antes de usar diluir a 1x combinando 200 ml de solución 5x en 800 ml de agua destilada.

### **5.3 TBS Tween**

Cloruro de sodio NaCl ----- 8g.  
Tris 1M pH 7.6 ----- 20 ml.  
cbp un litro de agua destilada.

### **5.4 PBS 1x**

Cloruro de sodio NaCl ----- 8g.  
Fosfato de potasio  $K_2HPO_4$  ----- 1.21g.  
cbp un litro de agua destilada.

### **5.5 PBS TWEEN 20**

Cloruro de sodio NaCl ----- 8g.  
Fosfato de potasio  $K_2HPO_4$  ----- 1.21g.  
Tween ----- .2 ml.  
cbp un litro de agua destilada.