



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ELABORACIÓN DE UN BIOLÓGICO EXPERIMENTAL PARA LA PREVENCIÓN DE PASTEURELOSIS EN CONEJOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

**PRESENTA:**

MVZ. ANA BERTHA CERVANTES GARCÍA

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION FORESTAL AGRÍCOLA PECUARIA (INIFAP)

**COMITÉ TUTOR:**

DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN (FESC- UNAM)

DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (FMVZ-UNAM).

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

Septiembre 2016.



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

Resumen.....	5
Introducción.....	6
1.1 Generalidades .....	6
1.2 Historia.....	7
1.3 Pasteurelisis.....	7
1.4 Características generales de <i>Pasteurella multocida</i> .....	8
1.4.1 Factores de virulencia.....	9
1.4.1.1 Cápsula.....	9
1.4.1.2 Toxina de <i>Pasteurella multocida</i> (PMT).....	10
1.4.1.3 Lipopolisacárido (LPS).....	11
1.4.1.4 Fimbrias.....	12
1.4.1.4 Proteínas de membrana externa (OMP).....	13
1.4.2 Pasteurelisis en conejos.....	13
1.5 Vacunación contra <i>P. multocida</i> .....	15
1.5.1 Vías de administración.....	15
1.5.2 Número de dosis.....	15
1.5.3 Tipos de vacunas.....	16
2. Justificación.....	19
3. Objetivos.....	21
4. Hipótesis.....	22
5. Material y métodos.....	23
6. Resultados.....	30
7. Discusión.....	36
8. Conclusiones.....	41
Anexos .....	42
Literatura citada.....	50

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Elementos de la PCR de <i>Pasteurela multocida</i> tipo A.....	26
Cuadro 2. Elementos de la PCR de <i>Pasteurela multocida</i> tipo D.....	27
Cuadro 3. Estados muestreados y cantidad de muestras colectadas.....	30
Cuadro 4. Prueba de $X^2$ . .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Frotis de <i>P. multocida</i> con tinción de gram vista con el objetivo de 100x.....	31
Fig. 2 Prueba de descapsulación por hialuronidasa;.....	31
Fig. 3 PCR de tipificación capsular para <i>Pasteurella multocida</i> tipo A.. .....	32
Fig. 4 PCR de tipificación capsular para <i>Pasteurella multocida</i> tipo D.....	33

## Resumen.

La pasteurelosis causada por *Pasteurella multocida*, es una de las principales enfermedades que afectan a conejos en granjas cunícolas del país, sin embargo, no existe ningún biológico para su prevención. El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de un biológico experimental para la prevención de pasteurelosis en conejos. Para ello se muestrearon granjas de los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Coahuila, Morelos, Guanajuato, Estado de México y Ciudad de México. Se obtuvieron 51 aislamientos identificados como *P. multocida* por métodos convencionales como frotis teñidos con Gram, pruebas bioquímicas de citrato, urea, indol, oxidasa, triple azúcar hierro. Se determinó el tipo capsular A por descapsulación por hialuronidasa, y PCR. De los aislamientos obtenidos 43 fueron de tipo capsular A (84%), 1 de tipo D (2%) y 7 no fueron tipificables (14%). Se seleccionaron algunos de los aislamientos para la elaboración de dos tipos de inmunógenos; uno inactivado con células completas (CC) a una concentración de  $1.5 \times 10^9$  UFC/mL y otro constituido por el sobrenadante obtenido del mismo cultivo (SB). Se formaron tres grupos de 10 conejos cada uno, el primero se inmunizó con 0.5 mL de la bacterina 1, el segundo con 0.5 ml del sobrenadante y el tercero con 0.5 mL de solución salina fisiológica, todos por vía subcutánea. Quince días después se revacunaron con una dosis igual a la anterior, finalmente al día 30 fueron desafiados con 1 mL de una cepa virulenta obtenida del mismo muestreo y a una concentración de  $1.2 \times 10^5$  UFC/mL por vía intranasal. A los animales que murieron durante el desafío se les realizó una necropsia y aislamiento bacteriano de pulmón en agar sangre, el resto fue sacrificado a las 2 semanas y se repitió el mismo procedimiento. Se realizó un análisis multivarianza (ANOVA) de las temperaturas registradas en los primeros 3 días postinfección, con un poder de significancia  $< 0.001$  entre grupos y dentro de ellos. Las variables cualitativas se midieron con la prueba de  $X^2$  y la prueba de Fisher. Los conejos inoculados con la bacterina completa mostraron mayor protección cuando se les comparó con la cantidad de crecimiento bacteriano.

### Palabras clave:

Pasteurelosis, inmunógeno, conejos.

## Abstract

Pasteurellosis, a disease caused by *Pasteurella multocida*, is one of the most common diseases which affects rabbit production in Mexico; nevertheless, there is no vaccine available to prevent it. The aim of this work was the development of an experimental vaccine for pasteurellosis prevention in rabbits. To achieve it, farms from the states of Hidalgo, Tlaxcala, Coahuila, Morelos, Guanajuato, Estado de México and México City were sampled; 51 isolates identified as *P. multocida* were obtained through classic techniques like Gram stain, biochemical test including: Citrates, Urea, Indole, Oxidase and Triple Sugar Iron (TSI). The capsular type (A and D) were determined by Hyaluronidase Decapsulation, Acriflavine Flocculation and PCR. 43/51 isolates had Capsule type A (84%), 1/51 had capsule type D (2%) and 7/51 were unable to typify (14%). Some isolates were chosen to prepare two immunogens, one made of whole cells with a dilution known of  $1.5 \times 10^9$  UFC/mL (bacterin) and the second made with the supernatant collected from the bacterial culture. Three groups with 10 rabbits each one were used. The first group was immunized with the bacterin (0.5mL), the second group was immunized with the supernatant (0.5mL) and third one with physiologic saline solution (0.5mL). All groups were immunized subcutaneously at days 1 and 15. 30 days after the first immunization the three groups were challenged intranasally with 1mL of *P. multocida* (highly virulent strain from farm samples) at a dilution of  $1.2 \times 10^5$  UFC/mL. Necropsy and bacterial isolation were performed in animals killed 15 days after the challenge; it was also performed in animals dead during the testing. Bacterial isolation was achieved from samples taken from lungs and growth in Blood Agar. Multivariate ANOVA from temperatures among groups obtained in the first 3 days post-infection was performed, with a significance ( $p < 0.001$ ). Qualitative variables were analyzed with  $\chi^2$  and Fisher's tests. In conclusion, rabbits inoculated with the bacterin, showed higher protection when compared with bacterial growth amount.

### Key words

Pasteurellosis, vaccine, rabbits.

## Introducción

### 1.1 Generalidades

La situación de la cunicultura en México es limitada, se sabe que al menos 25 estados de la República Mexicana reportan producción de conejo. Entre los más importantes se encuentran Puebla, Tlaxcala, Morelos, Ciudad de México, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco y Estado de México (ANCUM 2010).

De acuerdo a un estimado realizado por el Comité Nacional Sistema Producto Cunícola (CNSPC), para 2014 calculó la existencia de 309,989 conejas en producción que producen carne con un valor aproximado de 870 millones de pesos. Clasificándose el 65% de la cunicultura nacional como de traspatio y el 35% semi-industrial tecnificada (CNSP, 2015).

Una de las principales afecciones en las granjas cunícolas son las infecciones del aparato respiratorio en conejos, las cuales disminuyen notablemente la producción y ocupan el segundo lugar en cuanto a importancia después de las infecciones gastrointestinales (Lu et al., 1983; Rosell, 2003). Las infecciones respiratorias producen graves pérdidas económicas debido a que afectan todos los eslabones de la cadena productiva, desde los gazapos hasta los adultos, así como el elevado costo de su control (Villa et al., 2001).

La prevalencia de lesiones neumónicas macroscópicas de animales clínicamente sanos, de 8 a 10 semanas de vida, pueden llegar hasta un 20%. En rastros se han encontrado problemas de otitis media en animales jóvenes en un 4% y en adultos un 32%. En conejas reproductoras eliminadas se confirmó la implicación de *Pasteurella spp.* en el 29.1% de las lesiones, el 76.9% en neumonías y 77.3% de piometras (Astorga et al., 1997).

La pasteurelisis, se describe como una enfermedad infecciosa de gran importancia por morbilidad, mortalidad y prevalencia en explotaciones cunícolas (Astorga et al., 1997). Las bacterias más comúnmente aisladas en este tipo de problemas son *P. multocida*, *Bordetella brochiseptica* y *Mannheimia haemolytica* (Webster, 1924), siendo *P. multocida* la de mayor importancia (Wilkie et al., 2012).

## 1.2 Historia

El nombre del género *Pasteurella* fue propuesto por Trevistan en 1887 en honor a Louis Pasteur quien en 1881 identificó por primera vez a *Pasteurella multocida* como el agente causal del cólera aviar (Pasteur, 1881; Harper et al., 2006; Ledermann, 2007), aunque antes de él en 1978, Klett ya había hecho un aislamiento de lo que parecía ser *P. multocida* durante una epidemia en cerdos salvajes (Ledermann, 2007).

Este microorganismo tuvo muchos cambios de nombre a lo largo del tiempo, por ejemplo, *Micrococcus gallicidus* en 1883 (García, 2010), *Bacterium bipolarmulticidum* en 1885 (Kit, 1893), *Bacterium septicaemia haemorrhagica*, nombre asignado por Hueppe en 1886 quien intentaba agrupar aislamientos procedentes de distintas patologías en distintas especies pero que compartían características similares (Ledermann, 2007; García, 2010).

El nombre de *Pasteurella* fue asignado a este género oficialmente hasta 1920 y las especies eran nombradas dependiendo del animal de donde se aislaron. Finalmente, en 1939 todas estas supuestas especies fueron agrupadas por Rosenbusch y Merchant en una sola que se llamó *Pasteurella multocida* (Weber et al., 1984; Ledermann, 2007).

En 1917 surgió el primer reporte de este microorganismo afectando al hombre que fue un granjero que presentó diarrea el cual trabajaba con aves infectadas por este agente. En el continente Americano, en Chile fue el primer caso relatado por Dussert de un hombre con meningitis secundaria por *P. multocida* después de que el automóvil de este se impactara contra un gallinero (Ledermann, 2007).

Aunque en 1880 Pasteur y más adelante en 1904 Klett hablaban sobre la existencia de una toxina en este agente, fue hasta 1907 que se demostró la existencia de ésta (Macfadyen, 1907; Ledermann, 2007).

## 1.3 Pasteurelisis

*Pasteurella multocida* es el agente causal de una amplia gama de enfermedades, tanto en animales salvajes y domésticos. En algunas especies se presenta como patógeno primario y en algunas otras como secundario u oportunista (Boyce y Adler, 2000;

Anastasio et al., 2006; Wilson y Ho, 2013). En bovinos es causante de septicemia hemorrágica en ganado y búfalos de agua, y pasteurelosis neumónica en bovinos de todo el mundo (Campuzano et al., 2011), en cerdos es causante de rinitis atrófica (Wilkie et al., 2012) y en menor grado de neumonías (García, 2010), en aves de cólera aviar (Carter, 1972).

En humanos se han reportado casos de meningitis en niños y más comúnmente infecciones por mordidas y arañazos de perros y gatos ya que en estas dos especies *P. multocida* se presenta como comensal en cavidad oral, (Bhaver y Guy 1977; Weber et al., 1984; Wilson y Ho, 2013) en ovinos neumonía enzoótica (Soriano et al., 2012).

En conejos puede causar diversas patologías como son neumonías, rinitis (Harper et al., 2006), metritis (Badiola et al., 1992), tortícolis, otitis media (Deeb et al., 1990), abscesos (Deeb y DiGiacomo, 2000) y septicemia (Wilkie et al., 2012).

Esta bacteria se ha aislado de cavidad oral de animales salvajes como tigres, leopardos, pumas, lobos, chimpancés, leones marinos, morsas, focas y hasta dragones de Komodo, aparentemente sin relación con alguna patología (Wilson y Ho, 2013).

#### **1.4 Características generales de *Pasteurella multocida***

El género *Pasteurella* está dentro del orden Pasteurellales, familia Pasteurellaceae, un grupo que incluye, además, otros géneros como *Actinobacillus* y *Haemophilus* (Ledermann, 2007; Sanz, 2014). *Pasteurella multocida* es un pequeño cocobacilo Gram-negativo inmóvil (Chen et al., 2002; Anastasio et al., 2006) de 0,5x1µ, sin esporas ni flagelos y es aerobia facultativa. Crece en medios de cultivo que contengan sangre formando colonias no hemolíticas, circulares, de 1-3 mm de diámetro, convexas, de aspecto mucoso debido a la presencia de cápsula, grisáceo o blanquecino.

También crece en medios como Tripticosa Soya (TSA) e Infusión Cerebro Corazón (BHI) pero no en MacConkey. Son catalasa, oxidasa e indol positivas, así como fermentadoras de la sacarosa y el manitol (García, 2010; Sanz, 2014).

Este género actualmente comprende las siguientes especies: *P. aerogenes*, *P. anatis*, *P. bettyae*, *P. caballii*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. gallinarum*, *P. lymphangitidis*. Actualmente

en proceso de reclasificación (Gaillot *et al.*, 2013), *P. mairii*, *P. multocida*, *P. oralis* (Christensen *et al.*, 2012), *P. pneumotropica*, *P. skyensis*, *P. estomatitis*, *P. testudinis*, *P. ureae* y *P. volantium* (Wilson y Ho, 2013).

La especie *Pasteurella multocida* se subdivide en cuatro subespecies: *multocida*, *gallicida*, *séptica* y *tigris* (Capitini *et al.*, 2002). Se ha sugerido que existe relación entre subespecies y cuadro clínico (Biberstein *et al.*, 1991), por ejemplo, la subespecie *multocida* ha sido encontrada más frecuentemente de animales que presentaban cuadros respiratorios (García, 2010), mientras que la subespecie *séptica* se ha encontrado más en heridas producidas por mordeduras y arañazos de perros y gatos (Dees *et al.*, 1981).

### **1.4.1 Factores de virulencia**

Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad que le ayudan a evadir las defensas dentro de un organismo vivo (Cárdenas *et al.*, 2014). A lo largo de la evolución, estos mecanismos les han permitido invadir, adherirse, expresar receptores, colonizar, evadir al sistema inmune y acceder a los nutrientes necesarios.

Muchos factores han sido estudiados como posibles implicados en la virulencia de *P. multocida*, y aunque en la mayoría no se ha demostrado una relación directa con la virulencia, en algunos como la toxina PMT y la cápsula se conoce claramente su función (García, 2010).

#### **1.4.1.1 Cápsula**

En 1955, Carter identificó mediante la prueba de hemaglutinación indirecta cinco tipos capsulares (A, B, D, E y F) con base en sus diferentes antígenos capsulares, estos tipos están asociados pero no restringidos a un huésped (Campuzano *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2014). Por diferentes métodos se ha identificado la composición de los diferentes tipos capsulares; mediante resonancia magnética nuclear se confirmó que el principal componente de la capsula de tipo A es el ácido hialurónico (Rosner *et al.*, 1992; Pandit y Smith, 2014).

Mediante la acción de mucopolisacaridasas se identificó a la heparina como principal componente de la cápsula de tipo D y al sulfato de condroitina en el tipo F (Rimler et al., 1994; DeAngelis et al., 2002).

Mediante análisis de carbohidratos se encontró que la capsula de tipo B está compuesta por arabinosa, manosa y galactosa. La composición del tipo E se desconoce (Towsend et al., 2001; Wilkie et al., 2012).

En México existen informes de aislamientos de tipo capsular A y D en bovinos y caprinos (Colin et al., 1987; Trigo, 1988; Blanco-Viera et al., 1993; Pijoan et al., 1999; Gutiérrez et al., 2004; Villegas et al., 2013); y de tipo capsular A en conejos y aves (Guadarrama et al., 2009; Orea, 2011; Soriano et al., 2012).

Numerosos estudios han demostrado la importancia de la capsula de *P. multocida* en la virulencia. Se sabe que las cepas con capsula son más virulentas que las cepas acapsuladas (Heddleston et al., 1964; Jacques et al., 1993; Boyce et al., 2000; Harper et al., 2006). Se ha demostrado que mutantes acapsuladas del tipo A y B inoculadas en aves y ratones pierden su virulencia (Rosenbusch y Merchant, 1939). Otros estudios muestran que cepas capsuladas pueden ser poco virulentas (Matsumoto y Strain, 1993), lo que indica que, aunque la cápsula es muy importante, existen otros factores implicados en la virulencia de *P. multocida*.

Esta estructura le ayuda a la bacteria a evadir la fagocitosis y al sistema del complemento (Rimler et al., 1995; Boyce et al., 2000; Chung et al., 2001), esta aumenta la capacidad de la bacteria de adherirse a la célula hospedadora (Sanz, 2014), además de protegerla de la deshidratación (Ophir et al., 1994).

#### **1.4.1.2 Toxina de *Pasteurella multocida* (PMT)**

La PMT es un miembro de la familia de las toxinas dermonecróticas, es una proteína formada por 1,285 aminoácidos y un peso de 146 kDa (Wilkie et al., 2012), es una toxina de tipo AB, contiene un dominio de unión al receptor y translocación (B) y uno de dominio biológicamente activo (A). Los dominios de unión al receptor de PMT se encuentran en la parte N-terminal y los dominios activos en el C-terminal (Busch et al., 2001). Se sabe

que esta toxina es producida en la fase estacionaria de cultivo y al parecer se libera durante la lisis celular para posteriormente situarse en el citoplasma de la célula hospedadora (García, 2010; Wilkie et al., 2012).

En 1989 Petersen y Fodged aislaron y caracterizaron el gen que codifica la PMT, este gen fue llamado *toxA* y es transportado en un fago lisogénico (Pullinger et al., 2004). Se ha demostrado que PMT es un potente mitógeno que estimula la resorción del hueso produciendo rotura por acción de osteoclastos (Sterner-Kock et al., 1995).

Esta toxina es producida principalmente por el tipo capsular D, aunque también ha sido encontrada en el tipo capsular A (García, 2010; Pullinger et al., 2004). Su presencia está relacionada directamente con la atrofia de cornetes nasales en cerdos y conejos (García, 2010; Nielsen et al., 1986).

En un trabajo realizado por Petersen (1991) se demostró que PMT actuaba como inmunógeno cuando se inoculó en ratones y que cuando era genéticamente modificada y administrada en cerdos les confería protección (Petersen et al., 1991) razón por la cual se han producido bacterinas toxoide.

#### **1.4.1.3 Lipopolisacárido (LPS)**

En el siglo XVIII cuando se evidenció la presencia de una molécula que inducía fiebre y enfermedad se comenzó a investigar, pero fue hasta la década de 1940 cuando se logró conocer las características de este componente que se le llamó lipopolisacárido (Romero e Iregui, 2010). El LPS es un componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, es un factor de virulencia esencial de *P. multocida* (Harper et al., 2011; Wilson y Ho, 2013).

La estructura del LPS consta del lípido A o endotoxina, un núcleo y un antígeno "O", esta última porción es altamente variable entre especies bacterianas (Romero e Iregui, 2010) (Harper et al., 2011). Su importancia en la virulencia se dio a conocer en un trabajo desarrollado por Fernández de Henestrosa (1997) con una mutante con delección de un gen importante en la producción del LPS, el resultado fue que la bacteria quedó altamente atenuada.

Dentro de las funciones del LPS se encuentran: mantenimiento y organización de la membrana externa, mimetismo molecular, inhibición de anticuerpos, variaciones antigénicas, activador del sistema inmune y mediación en la adherencia a las células y tejidos hospederos, entre otras (Jacques, 1994).

*P. multocida* tiene 16 serotipos basándose en sus antígenos del LPS enumerados del 1 al 16 (Wilkie et al., 2012) y juega un papel importante en la patogénesis y en la colonización nasal, además de ser estimulante de inmunidad humoral produciendo anticuerpos protectores (Sanz, 2014).

#### **1.4.1.4 Fimbrias**

La colonización de los tejidos del hospedador es facilitada por varios tipos de lectinas, una de las más importantes es la fimbria tipo IV, de naturaleza proteínica que es utilizada por las bacterias Gram-negativas entre ellas *P. multocida* (Heckels, 1989; Wilkie et al., 2012).

Dentro de las funciones que desempeña la fimbria se encuentra la adhesión a las células del tracto respiratorio, la localización cercana a los suministros de alimentos y la resistencia ante el desprendimiento por los fluidos que limpian la mucosa. En el caso particular de *P. multocida* se sabe que forma uniones irreversibles de fimbria tipo 4 con manosa, de modo que solo las bacterias que poseen estas lectinas son capaces de adherirse (Romero, 2012; Carrillo, 2013).

La fimbria tipo 4 de *P. multocida* es codificada por el gen *ptfA* (Doughty et al., 2000; García, 2010) y se demostró su presencia tanto como en variantes capsuladas como en aquellas que carecían de cápsula (Isaacson y Trigo, 1995).

Trabajos recientes buscan evitar la adhesión de *P. multocida* mediante la administración de azúcares con capacidad de interferir en la adhesión de la bacteria y así bloquear la unión al epitelio respiratorio (Carrillo, 2013).

#### **1.4.1.4 Proteínas de membrana externa (OMP)**

Las proteínas de membrana externa se encuentran en gran cantidad de bacterias Gram-negativas entre ellas *P. multocida*, siendo de gran importancia para este agente por su patogenicidad y por lo tanto participan en la respuesta inmune (Sanz, 2014).

#### **1.4.2 Pasteurelisis en conejos**

La importancia de *P. multocida* reside en el gran número de especies animales que afecta y la variedad de síndromes con los que está asociada (Wilkie et al., 2012). Como agente etiológico *P. multocida* generalmente se presenta como un agente primario (Pijoan y Ochoa, 1978; Wilson y Ho, 2013; Selva et al., 2007; Wilkie et al., 2012). La patogenia depende de la resistencia del hospedador y de la virulencia de la cepa (Deeb y DiGiacomo, 2000).

##### **1.4.2.1 Factores predisponentes**

Los factores ambientales juegan un papel importante en el proceso de infección de *P. multocida*, ya que al ser este un agente secundario necesita las condiciones adecuadas para poder colonizar. Dentro de los principales factores se pueden mencionar el amoníaco emanado de las deyecciones que en conjunto con una mala ventilación producen estrés y una baja en la ingesta de alimento en los conejos (Roca, 1980; Selva et al., 2007; Dyavolova et al., 2013).

Además, los niveles altos de este componente en el aire pueden producir una rinitis con una producción de moco denso lo que dificulta la eliminación de cuerpos extraños por los movimientos ciliares (Kloseek et al., 2000). Los cambios bruscos de temperatura y el polvo también pueden favorecer la colonización bacteriana (Selva et al., 2007).

##### **1.4.2.2 Transmisión**

Las vías de transmisión son dos, una es la vía directa que se presenta por contacto directo con secreciones y otra es la vía indirecta a través de fómites como alimento y agua contaminada. Las posibilidades de contagio aumentan con el estrés, malas condiciones medioambientales y algún deterioro en la salud general (Selva et al., 2007; Martinez et al., 2010; Wilson y Ho, 2013).

### **1.4.2.3 Patogenia**

En conejos el daño causado por este agente comienza con una rinitis (Suckow et al., 2008; Sanz, 2014) cuando el agente llega a pulmones puede causar neumonía (Wilkie et al., 2012) y a partir de este órgano, algunas cepas son capaces de invadir otros órganos (Selva et al., 2007; Sanz, 2014).

Dependiendo del órgano donde se sitúe puede provocar diversos cuadros clínicos como otitis media y torticollis (Deeb et al., 1990), conjuntivitis, neumonía, rinitis (Harper et al., 2006), pericarditis, abscesos (Deeb y DiGiacomo, 2000), metritis (Badiola et al., 1992), orquitis (Selva et al., 2007) y septicemia (Wilkie et al., 2012).

### **1.4.2.4 Diagnóstico**

Para el diagnóstico definitivo es necesario identificar el agente por medio de cultivo bacteriano en agar sangre donde después de 24 horas crecen colonias no hemolíticas, circulares, de 1-3 mm de diámetro, convexas, de aspecto mucoso, grisáceo o blanquecino (Quinn et al., 1999), al frotis se observan cocobacilos Gram-negativos, inmóviles, sin esporas ni flagelos, de  $0,5 \times 1 \mu$ . Bioquímicamente se caracterizan por ser oxidasa, catalasa e indol positivas. Otra manera es la detección de anticuerpos por medio de ELISA (Manning, 1984).

### **1.4.2.5 Tratamiento y Control**

Aunque *P. multocida* es sensible a una amplia gama de antibióticos, pocos son los que se pueden usar en conejos debido a sus efectos adversos en la microbiota de este animal (Selva et al., 2007; Palócz et al., 2014). La tilmicosina, la ciprofloxacina y la enrofloxacin han sido probadas en conejos con buenos resultados (Okerman et al., 1990; McKay et al., 1996; Hanan et al., 2000; Okewole y Olubunmi, 2008). Desde luego que estos antibióticos presentan ciertas desventajas, por ejemplo, la tilmicosina por sus efectos miocardiotoxicos solo puede ser utilizada por vía intramuscular (Rosell et al., 2000).

Por mencionar otras desventajas de los antibióticos se puede decir que tienen un alto costo, que los tratamientos son largos e ineficaces y que debido al problema de

resistencia que presentan los antibióticos actualmente se opta por buscar alternativas como la administración de  $\beta$ -glucanos (Sanz, 2014; Palócz et al., 2014).

Para el control de las infecciones por *P. multocida* en las unidades de producción lo más efectivo son las medidas higiénico-sanitarias como la desinfección constante de instalaciones y la eliminación de enfermos crónicos, así como el control de la humedad, la temperatura y la ventilación de la explotación (Selva et al., 2007; Sanz, 2014).

En varios países utilizan la vacunación como una medida profiláctica, pero en México no existe ninguna vacuna comercial registrada para prevenir pasteurelisis en conejos (Astorga et al., 1997)a

## **1.5 Vacunación contra *P. multocida***

La vacunación ha demostrado ser el método preventivo más económico y efectivo para conferir protección y minimizar los efectos causados por *P. multocida* (Guadarrama et al., 2010), por ello se han realizado numerosos ensayos en los cuales elaboraron y probaron biológicos buscando que induzcan una buena respuesta inmune contra este agente.

### **1.5.1 Vías de administración**

Varias vías de administración en diferentes especies han sido probadas, por ejemplo: vía oral, administrado en el agua para beber de aves (Heddleston et al., 1975), vía intranasal en ratones, conejos y pavos (Mukkur, 1978; Ringler et al., 1985; Lu et al., 1981; Pratner et al., 1990; Jarvinen et al., 1998; Jarvinen et al., 2000), vía subcutánea en conejos (Brown et al., 1970; Jarvinen et al., 1998; Nassar et al., 2011), vía intramuscular en aves, ratones y conejos (Suckow, 2000; Guadarrama et al., 2010).

### **1.5.2 Número de dosis**

Los trabajos realizados para saber cuántas dosis eran necesarias para inducir una buena respuesta del sistema inmune son diferentes. En trabajos realizados por Mukkur en 1978 no encontró diferencia significativa en la titulación de anticuerpos en animales inmunizados una o dos veces, aunque la mayoría de los autores recomiendan una dosis

de refuerzo a fin de lograr títulos de anticuerpos altos (Lu et al., 1981; Avakian et al., 1988; Ringler et al., 1985; Suckow, 2000; Guadarrama et al., 2010), de este modo aseguran una respuesta mayor y más rápida debido a las células de memoria.

### **1.5.3 Tipos de inmunización**

#### **1.5.3.1 Inmunización pasiva**

Estudios realizados en 1990 y 1991 utilizaron anticuerpos monoclonales contra LPS y proteínas de membrana externa de *P. multocida* y que fueron probados en ratón y conejo, mostraron resultados favorables ante el desafío homólogo; los ratones inmunizados con anticuerpos anti LPS mostraron una mortalidad del 33% comparado con el 100% del grupo control. Mientras que los anticuerpos dirigidos contra proteínas de membrana externa reconocieron exitosamente su blanco y la colonización de esta bacteria en pulmones se redujo hasta 84.75 veces, no protegió ante el desafío homólogo (Wijewardana et al., 1990; Lu et al., 1991).

#### **1.5.3.2 Bacterinas**

Las vacunas inactivadas de *P. multocida* se han preparado por varios métodos como calor, secado, formol y azida de sodio (Ahmad et al., 2013).

Se han realizado diversos trabajos con vacunas inactivadas utilizando diferentes adyuvantes como hidróxido de aluminio, adyuvante oleoso solo (Verma y Jaiswal, 1998) y con saponinas (Kumar et al., 2012) y recientemente propóleo (Nassar et al., 2011). El propóleo mejoró la respuesta inmune, el adyuvante oleoso brinda una protección más duradera a comparación del hidróxido de aluminio y cuando a este se le agregaron saponinas se observó un aumento significativo en células T CD4+ y T CD8+ en ratones y terneros de búfalos (Verma y Jaiswal, 1998; Kumar et al., 2012; Nassar et al., 2011).

Otro tipo de vacunas inactivadas son las elaboradas a partir de extracto bacteriano de *P. multocida* obtenido con tiocianato de potasio (KCNS), solo o con *P. multocida* inactivada (Mukkur, 1978; Ringler et al., 1985; Jarvinen et al., 1998). Las que fueron elaboradas con

ambos compuestos mostraron mayor protección a comparación de las que solo tenían el extracto. Jarvinen (2000) probó este extracto encapsulado en alginato, logrando niveles más altos de IgG, IgM e IgA.

Varios autores probaron vacunas producidas con sobrenadante de lavados bacterianos, las cuales brindaron una protección que va del de 77 al 100% de protección (Brown et al., 1970; Mukkur, 1997; Guadarrama et al., 2010), la protección en este tipo de vacunas se le atribuye a antígenos solubles en el sobrenadante principalmente proteínas de membrana externa.

### **1.5.3.2 Vacunas vivas atenuadas**

Dentro de las ventajas que tienen las vacunas vivas se pueden mencionar que son capaces de inducir inmunidad humoral y celular además de una mayor duración en la protección. Las desventajas son que pueden producir la enfermedad y esta puede ser transmitida a otros individuos (González-Hachero, 2005).

Algunos autores que probaron vacunas atenuadas por vía intranasal en pavos y conejos concluyen que, aunque la vacuna disminuye la mortalidad y brinda protección hasta por 13 meses, ésta no disminuye las lesiones en pulmón y fosas nasales (Lu et al., 1981; Pratner et al., 1990). Chengappa (1989) utilizó la vía intramuscular obteniendo resultados similares. Por otro lado, Rice (1979) utilizó la vía oral y administró la vacuna durante tres días consecutivos con un refuerzo cuatro semanas más tarde obteniendo niveles altos de protección.

### **1.5.3.3 Vacunas de ADN**

En la década de 1990 se demostró que se podía inducir una respuesta inmunitaria protectora contra virus en ratones inmunizados con ADN de éste (Mota-Sánchez, 2009). A partir de estos estudios se realizaron otros con antígenos bacterianos, de parásitos o tumorales. Fue hasta 2007 que se elaboró una vacuna de ADN contra *P. multocida*, realizada partir del gen *toxA* que codifica para la producción de la PMT y fue probada en ratones y cerdos, la cual aumentó la expresión de interferón, aunque solo en un pequeño grupo de cerdos y no resultó significativo en los valores de absorbancia de ELISA

obtenidos a partir de cada grupo y tampoco se mantuvo una respuesta inmune (Register *et al.*, 2007). Posteriormente se elaboraron vacunas con genes de la proteína de unión a transferrina, y de proteínas de membrana externa de *P. multocida* con resultados prometedores (Singh *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2013).

## 2. Justificación

Actualmente en nuestro país no se han realizado los estudios necesarios en salud cunícola que permitan determinar las causas principales de morbilidad y mortalidad a nivel nacional. Se cuenta con algunos datos generados de proyectos de investigación, donde informan sobre la presencia de algunos agentes etiológicos y la existencia de frecuencias de cuadros clínicos de diarreas y problemas respiratorios, sin que la información hubiera sido concluyente, pero si indicativa de la problemática. Esto permite afirmar que las enfermedades respiratorias y digestivas son problemas importantes que limitan el desarrollo de esta actividad, sin embargo, a la fecha no ha sido posible cuantificar las pérdidas que se ocasionan debido a estos problemas.

Además de los datos anteriores, los indicios existentes están basados en observaciones clínicas de asesores técnicos y de estudios aislados de laboratorio, además del testimonio y experiencia de los productores que refieren morbilidad y mortalidad de sus animales relacionados con problemas de catarro, abscesos, torcedura de cuello (tortícolis) y diarreas en gazapos. Dichas observaciones y el levantamiento de información en granjas con cuestionarios previamente elaborados, han permitido determinar que del 15 al 35% de los animales padecen éstas enfermedades.

Un aspecto importante que debe tomarse en cuenta, es que no existe suficiente información para dar recomendaciones preventivas específicas e integrales, dependiendo el tipo de granja que permitan reducir los padecimientos, es decir no se cuenta con información suficiente y confiable para determinar las posibles asociaciones e interacciones de los agentes etiológicos con el medio.

Otro aspecto importante es que no se cuenta con ningún biológico en el mercado nacional que permita complementar las medidas de prevención de la pasteurelosis, ni con la información necesaria para recomendar medidas específicas e integrales para prevenir esta enfermedad.

Es importante para cualquier industria pecuaria contar con biológicos específicos formulados a partir de cepas nacionales ya que la protección producida por los biológicos es específica de la serovariedad con la que están elaboradas.

A pesar de esta necesidad, los biológicos para prevenir la pasteurelisis en los conejos actualmente no están disponibles en nuestro país, debido a que no han sido desarrollados por ninguna institución de investigación y no ha sido solventada esta necesidad de la cunicultura nacional

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Desarrollar un biológico que pueda ser utilizado para prevenir y controlar la pasteurelisis en conejos.

### 3.2 Objetivos específicos

- Obtener aislamientos de *Pasteurella multocida* a partir de casos clínicos de conejos con problemas respiratorios.
- Determinar por medio de PCR los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* aislada de casos clínicos para conocer qué tipo capsular es el más frecuente.
- Elaborar dos biológicos para prevenir la pasteurelisis, utilizando dos aislamientos del tipo capsular que resulte más común.
- Evaluar los biológicos en conejos para probar su eficacia en condiciones experimentales y ver cual brinda mayor protección.

#### **4. Hipótesis**

El desarrollo y uso de un biológico formulado con aislamientos bacterianos (*Pasteurella multocida*) de casos clínicos en las zonas cunícolas de México y caracterizados molecularmente protegerá contra el desafío experimental en conejos.

## **5. Material y métodos**

### **5.1 Localización**

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del CENID de Microbiología en el INIFAP, Km 15.5 de la carretera México-Toluca, colonia Palo Alto, Distrito Federal, México.

### **5.2 Tipo de estudio**

El estudio realizado fue de tipo transversal ya que los sujetos de estudio fueron muestreados en una sola ocasión, se muestrearon los conejos que presentaron cuadro clínico respiratorio en ese momento.

### **5.2 Tipo de muestreo**

Se utilizó un tipo de muestreo no probabilístico llamado muestreo intencional o de conveniencia (Martin-Crespo y Salamanca, 2007) para lo cual se contactó a asociaciones de cunicultores en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Coahuila, Morelos, Guanajuato, Estado de México y Distrito Federal, los cuales facilitaron la localización de granjas en las que hubiera conejos con presencia de cuadro clínico respiratorio. Una vez que se contó con la aceptación de los cunicultores se procedió al muestreo de los animales.

### **5.3 Toma de muestra**

Se obtuvieron 179 muestras de exudado nasal de conejos enfermos del tracto respiratorio empleando hisopos comerciales con medio de transporte de Amies con carbón activado.

### **5.4 Criterios de inclusión de los conejos muestreados**

La población a muestrear incluyó conejos de todas las etapas productivas, siempre y cuando mostraran signos de enfermedad respiratoria.

## **5.5 Transporte de muestras**

Las muestras colectadas fueron conservadas en hieleras con gel refrigerante en un lapso no mayor a 24 horas hasta el laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología del INIFAP donde fueron procesadas.

## **5.6 Estudio bacteriológico**

Cada muestra fue sembrada por el método de estría en placa en una caja con agar sangre (Bioxon) adicionado con 5% de sangre de bovino, posteriormente se dejó incubar a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Se seleccionaron los aislamientos bacterianos que macroscópicamente presentaron las características del género *Pasteurella*: Colonias color blanco/grisáceo, de aspecto mucoso, brillante y colonias grandes.

## **5.7 Frotis bacteriano y tinción**

Se realizó un frotis (Anexo 1) colocando una pequeña gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos, se tomó una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido, se homogeneizó con la gota de agua, se fijó al calor y se dejó secar.

Posteriormente se realizó una tinción de Gram (Anexo 2) para observar al microscopio. Se eligieron las muestras que correspondían con coco-bacilos y afinidad tintorial Gram-negativos y se resembraron bajo las condiciones especificadas en el punto anterior.

## **5.8 Pruebas bioquímicas**

A las muestras identificadas como bacilos cortos Gram-negativos se realizaron las pruebas bioquímicas de citrato (Anexo 3), urea (Anexo 6), triple azúcar hierro (Anexo 5), indol (Anexo 4) y oxidasa (Anexo 7) con la finalidad de conocer si los aislamientos presentaban las características metabólicas de *P. multocida*, la cual es indol y oxidasa positiva, citrato y urea negativa y con reacción 6 para triple azúcar hierro.

## 5.9 Prueba de descapsulación por hialuronidasa

A los aislamientos que fueron caracterizados como *P. multocida* por pruebas bioquímicas se les realizó la prueba de descapsulación por hialuronidasa a fin de saber si los aislamientos correspondían con el tipo capsular A de este microorganismo. Para esta prueba las cepas se sembraron en agar sangre por estría continua y fueron cruzadas en el centro con la cepa Cowan de *Staphylococcus aureus* la cual es productora de hialuronidasa, se incubaron por 24 horas y posteriormente se observó cuales cepas presentaban una disminución del tamaño de la capsula cercana a la cepa de *S. aureus*.

## 5.10 Prueba de floculación por acriflavina

Para la prueba de acriflavina las cepas fueron cosechadas en tubos de 15 ml estériles con 3 ml de caldo BHI y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Posteriormente se centrifugaron a 6000 *g* por 10 minutos, se eliminó 2.5 ml del sobrenadante y se resuspendieron con 0.5 ml de acriflavina neutra a una concentración 1:1,000. Después de 5 minutos se visualizó, aquellas que presentaron formación de un floculo se identificaron como tipo D.

## 5.11 PCR para determinación de tipos capsulares A y D

### 5.11.1 Iniciadores

Se emplearon los iniciadores 1 CAPA-FWD: 5'-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3' e iniciador 2 CAPA-REV: 5'TTGCCATCATTGTCAGTG-3' descritos por Townsend (2001) para amplificar el segmento comprendido entre 8846 y 9873 pares de bases (pb) del gen *hyaD-hyaC* del serotipo A (acceso en GenBank AF067175). Dicho gen codifica para la síntesis de ácido hialurónico y amplifica un producto de 1044 pb.

Para la amplificación del segmento comprendido entre 3142 y 3766 pb del gen *dcbF* perteneciente al serotipo D, se utilizaron los siguientes iniciadores:

CAPD-FWD 5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' y CAPD-REV 5'-CATCTACCCACTCAACCATATCAG-3' (acceso en GenBank AF302466), mismos que

codifican para la síntesis de glicosil transferasa de la cápsula, que amplifica un producto de 657 pb.

### 5.11.2 Reactivos y condiciones de la reacción

Cada reacción de PCR para tipo A se realizó a un volumen final de 50  $\mu$ l, de los cuales 34.5  $\mu$ l fueron de agua estéril, 5  $\mu$ l de amortiguador 10x, 4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2  $\mu$ l de una mezcla de dNTP'S (10 mM), 2.0  $\mu$ l a una concentración de 25 pmol de cada uno de los iniciadores que identifican al serotipo capsular A, 0.5  $\mu$ l de enzima Taq polimerasa 5U/  $\mu$ l (INVITROGEN) y se agregaron al tubo al que previamente se le había agregado colonia bacteriana (Cuadro 1).

Para tipo D se realizó a un volumen final de 50  $\mu$ l, de los cuales de los cuales 35.5  $\mu$ l fueron de agua estéril, 5  $\mu$ l de amortiguador 10x, 3  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2  $\mu$ l de una mezcla de dNTP'S 10 mM, 2.0  $\mu$ l a una concentración de 25 pmol de cada uno de los iniciadores que identifican al serotipo capsular D, 0.5  $\mu$ l de enzima Taq polimerasa 5U/  $\mu$ l (INVITROGEN) y se agregaron al tubo al que previamente se le había agregado colonia bacteriana (Cuadro 2).

Cuadro 1. Reactivos de la PCR de *Pasteurela multocida* tipo A.

Elementos de la PCR	Cantidad
Buffer (Dream taq, Fermentas)	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (Thermo Scientific)	4 $\mu$ l
dNTP Mix (Invitrogen)	2 $\mu$ l
Iniciadores	2 $\mu$ l c/u
Taq polimerasa (Thermo Scientific)	.5 $\mu$ l
Agua	34.5 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

\*Cantidad por muestra.

Cuadro 2. Reactivos de la PCR de *Pasteurella multocida* tipo D.

Elementos de la PCR	Cantidad
Buffer (Dream Taq, Fermentas)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (Thermo Scientific)	3 µl
dNTP Mix (Invitrogen)	2 µl
Iniciadores	2 µl c/u
Taq polimerasa (Thermo Scientific)	.5 µl
Agua	35.5 µl
Total	50 µl

La amplificación se realizó en un termociclador de la marca MultiGene OptiMax Thermal Cycler de Labnet bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 56.5°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos por 30 ciclos para amplificar los genes correspondientes a los serotipos capsulares A y D de *Pasteurella multocida*. La visualización de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa a 1% teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 KB Plus (Invitrogen). El tamaño del producto de amplificación para el tipo capsular A fue de 1,044 pb y para el tipo capsular D de 657 pb. Como control negativo se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus*.

## 5.12 Elaboración de los biológicos

Para la elaboración de los biológicos primeramente se eligieron dos aislamientos correspondientes a granjas que presentaron cuadros graves de pasteurelosis, se sembraron en agar sangre y se incubaron por 24 horas a 37°C, se cosechó en 100 ml de caldo BHI a razón de dos asadas por cada aislamiento y se dejaron en agitación a 200 g y cada hora se midió su Densidad Óptica (DO) de 780 nm y se hizo una curva de

crecimiento, a diferentes valores de DO se hizo la técnica de dilución para hacer conteo en placa y calcular factor de dilución.

Una vez ajustada la concentración a  $1.5 \times 10^9$  UFC/mL, al inóculo se le realizaron pruebas de pureza y fue inactivado con formol al 0.2%, posteriormente se sembró en una caja de agar sangre a 37°C durante 24 horas para comprobar la ausencia de crecimiento bacteriano. Finalmente se agregó hidróxido de aluminio como adyuvante a una concentración final del 1%. El contenido final fue dividido en dos partes iguales; uno se conservó completo en refrigeración y la otra mitad se centrifugó a 3,776 g por 7 min y se tomó el sobrenadante.

### **5.13 Animales utilizados y condiciones de alojamiento**

Se utilizaron 30 conejos machos con un peso de 1.5 kilos aproximadamente, estos conejos se compraron en la granja de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Se alojaron en módulos, poniendo 2 conejos por jaula. Los animales se alimentaron con alimento concentrado comercial, agua *ad libitum*. Los conejos tuvieron un periodo de adaptación de dos semanas antes de ser utilizados, en este lapso se les realizó un muestreo para descartar que fueran portadores de *P. multocida*. El lugar destinado para los animales fue previamente desinfectado y fue adaptado para evitar corrientes de aire.

### **5.14 Inmunización**

Los 30 conejos fueron divididos tres grupos de diez, el primer grupo fue inmunizado con 0.5 ml de la bacterina completa ( $1.5 \times 10^9$  UFC/mL), el segundo con 0.5 ml del sobrenadante ( $1.5 \times 10^9$  UFC/mL ) y el tercero (testigo) con 0.5 ml de agua inyectable, dos semanas después fueron reinmunizados con una dosis igual a la aplicada a cada grupo.

### **5.15 Desafío**

Previo al desafío se eligió uno de los aislamientos de *P. multocida* obtenido durante el muestreo, el cual provenía de una granja con problema grave de pasteurelisis; dicho aislamiento estuvo conservado a -168°C durante 6 meses y fue pasado por un conejo para regresar su virulencia inicial.

Una vez recuperada la cepa se hizo una suspensión en BHI, la cual se ajustó a una concentración de  $1.2 \times 10^5$  UFC/ml y se inoculó con 0.8 ml por vía intranasal al total de conejos.

### **5.16 Sacrificio y necropsias**

A los animales que murieron durante el desafío se les realizó necropsia y posteriormente se realizó impronta de porciones de pulmones sobre el agar sangre con la finalidad de recuperar la bacteria.

Los sobrevivientes al desafío fueron sacrificados según la norma NOM-033-ZOO-1995 una semana después, recolectándose los pulmones para hacer aislamiento bacteriano.

## 6. Resultados

### 6.1 Muestreo

De los siete estados muestreados se obtuvieron un total de 179 muestras de exudado nasal de conejos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estados en los que se colectaron muestras para buscar aislamientos de *P. multocida*.

Estado	Número de muestras	Aislamientos obtenidos
Tlaxcala	14	1
Ciudad de México	39	8
Coahuila	8	4
Hidalgo	25	2
Estado de México	66	24
Morelos	12	6
Guanajuato	15	6
<b>Total</b>	<b>179</b>	<b>51</b>

## 6.2 Estudio bacteriológico

A las 179 muestras obtenidas se les realizó cultivo en agar sangre, descartando las que no mostraron la morfología macroscópica y microscópica de *P. multocida*. 51 se identificaron como *P. multocida* (Figura 1) por sus características bioquímicas.

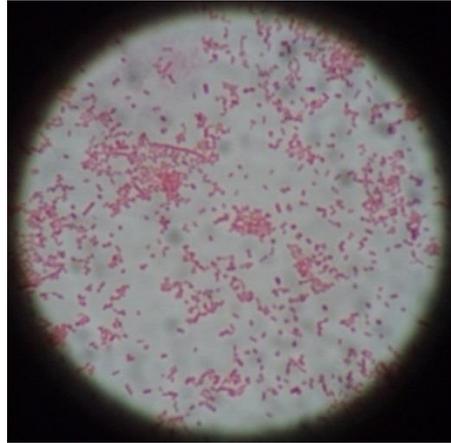


Figura 1. Frotis de *P. multocida* con tinción de gram vista con el objetivo de 100x.

## 6.3 Prueba de descapsulación por hialuronidasa

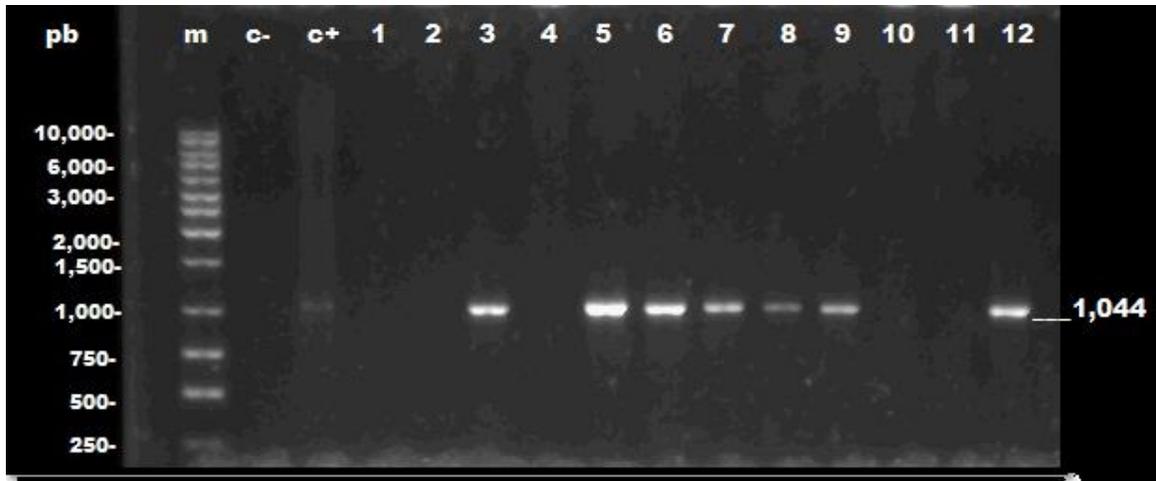
De los 51 aislamientos, 43 resultaron positivos a la prueba de descapsulación por hialuronidasa, la cual nos indica que se trata de *P. multocida* de tipo capsular A (Figura 2).



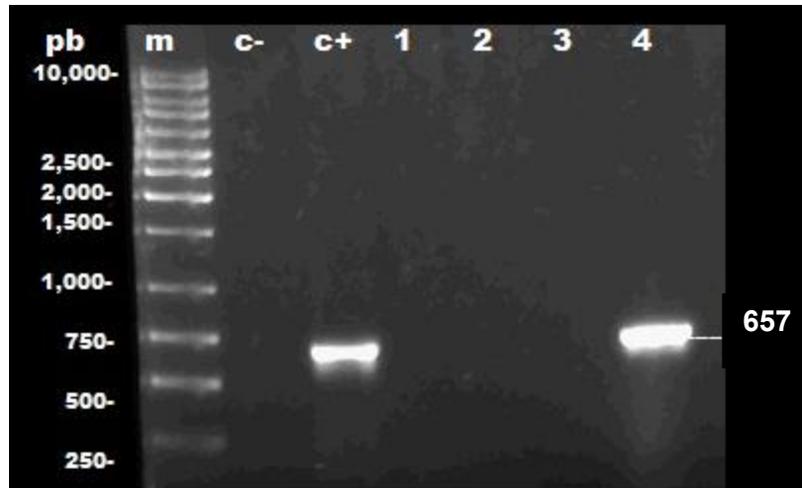
Figura 2. Prueba de descapsulación por hialuronidasa; se pueden apreciar colonias de *P. multocida* sin apariencia mucoide cercanas a la línea de *S. aureus*, lo que indica ausencia de capsula.

## 6.4 Determinación de tipos capsulares A y D por PCR

Mediante PCR se identificaron los tipos capsulares de los 51 aislamientos caracterizados como *P. multocida*. De este total se encontró que 43 (84%) correspondían con el tipo capsular A (Fig. 3), 1 (2%) correspondió al tipo capsular D (Fig.4) y 7 (14%) no amplificaron.



**Figura 3. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Para la tipificación capsular de *Pasteurella multocida* tipo A. Carriles del 1 al 12: muestras de campo. Carril C+ control positivo serotipo A (ADN de la cepa de referencia ATCC 12945), C- control negativo cepa de *Staphylococcus aureus*. Carril M marcador DNA de peso molecular. Gel de agarosa al 1%.



**Figura 4. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Para la tipificación capsular de *Pasteurella multocida* tipo D. Carriles del 1 al 12 muestras de campo. Carril C+ control positivo serotipo A (ADN de la cepa de referencia ATCC 12948), C- control negativo cepa de *Staphylococcus aureus*. Carril M marcador DNA de peso molecular. Gel de agarosa al 1%.

## 6.5 Análisis estadístico

En cuanto a las temperaturas de los conejos, en la segunda semana de adaptación el promedio fue de 38.5°C. En el día 1 post-desafío fue de 39.47°C (38.9-39.9), durante el día 2 fue de 39.2°C (38.94-39.96), en el día 3 de 39.1°C (38.60-39.6) y una temperatura promedio en los 3 grupos de 38.8°C (38.61-38.99). Considerando la temperatura de un conejo sano, estos números indican fiebre.

Para la búsqueda del poder estadístico de la temperatura en el tercer día postdesafío y en la temperatura promedio, se realizó un análisis multivarianza (ANOVA) con un poder de significancia < 0.001 en las cuatro temperaturas analizadas entre grupos y dentro de los grupos.

De los 10 conejos de cada grupo, los tratados con la bacterina completa y sobrenadante no mostraron manifestaciones clínicas sugestivas a enfermedad respiratoria. En cambio, en el grupo testigo 8/10 conejos mostraron signos con un poder estadístico < 0.001.

Las variables cualitativas se midieron con la prueba de  $X^2$ , cuando la variable era menos a 5, esta se midió con la prueba de Fisher, comparando en una tabla de 2x2 las variables

con mayor correlación en base a la prueba de correlación de Person; mostrando correlación significativa estadística ( $\alpha < 0.05$ ) 8 veces más entre los conejos muertos con respecto al crecimiento bacteriano.

Cuando la temperatura del día 2 post-desafío fue alta, hubo 2 veces más probabilidad de presentación de signos clínicos comparado con los que no tuvieron temperatura alta. Los conejos que presentaron signos clínicos tuvieron 24 veces más probabilidad de morir en comparación a los que no mostraron signos clínicos.

Los conejos que presentaron fiebre en el segundo día post-desafío presentaron signos indicativos de enfermedad respiratoria en comparación con los que no presentaron fiebre en ese día.

Los animales que presentaron manifestaciones clínicas, al aislamiento presentaron hasta 30 veces mayor número de colonias bacterianas en comparación a los que no mostraron signos clínicos.

Finalmente, los conejos inmunizados con la bacterina completa presentaron 9 veces mayor protección al crecimiento bacteriano, es decir, los conejos que fueron inmunizados con bacterina completa no presentaron crecimiento en el cultivo, en cambio los que se inmunizaron con el sobrenadante mostraron poco crecimiento bacteriano, siendo el grupo testigo el que mayor crecimiento bacteriano mostró y a su vez los que más signos clínicos mostraron con un  $\alpha < 0.05$  (Cuadro 4).

Cuadro 4. Prueba de X<sup>2</sup>.

<b>Variables</b>	<b>OR</b>	<b>IC</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>α</b>
MUERTE/CRECIMIENTO +++	8.57	0.76-	3.84	0.05
T° DIA 1 POSTDESAFÍO/Sx	1.60	1.17-	1.33	0.24
T° DIA 2 POSTDESAFÍO/Sx	1.60	1.17-	3.21	0.05
T° DIA 3 POSTDESAFÍO/Sx	1.66	1-21-	3.0	0.08
CRECIMIENTO +++/Sx	30.0	2.79-	11.82	0.001
CRECIMIENTO +/Sx	0	0-0	1.87	0.17
SIN CRECIMIENTO/Sx	0	0-0	6.56	0.011
CRECIMIENTO +++/ Sx-	0	0-0	15.0	0.001
CRECIMIENTO +/Sx-	0	0-0	1.87	0.17
SIN CRECIMIENTO/Sx-	0	0-0	6.57	0.01
Sx/MUERTE	24	1.85-	9.11	0.002
BACTERINA/CRECIMIENTO +++	1	0.15-	0.0	1.00
BACTERINA/CRECIMIENTO +	0.23	0.24-	1.7	0.18
BACTERINA/ SIN CRECIMIENTO	9.33	1-51-	6.69	0.009
SOBRENADANTE/CRECIMIENTO	0.10	0.01-	5.18	0.02
SOBRENADANTE/CRECIMIENTO	30.0	2.79-	11.82	0.001
SOBRENADANTE/SIN	0.66	0.14-	0.26	0.60
TESTIGO/CRECIMIENTO +++	36.0	4.28-	14.7	0.001
TESTIGO/CRECIMIENTO +	1.0	0.15-	0.0	1.00
TESTIGO/SIN CRECIMIENTO	0.04	0.04-	10.54	0.001
BACTERINA/Sx	0.23	0.02-	1.77	0.18
BACTERINA/Sx-	4.28	0.44-	1.78	0.19
SOBRENADANTE/Sx	0.23	0.02-	1.77	0.18
SOBRENADANTE/Sx-	4.28	0.44-	1.78	0.19
TESTIGO/Sx	30.0	2.79-	11.82	0.001
TESTIGO/Sx-	0.03	0.003-	11.82	0.001

## 7. Discusión

El proyecto se inició con un muestreo de conveniencia en 24 granjas de pequeños productores pertenecientes a las Asociaciones locales de 7 estados del país, se muestreo solo a animales con signos clínicos de enfermedad respiratoria, obteniendo 179 muestras de exudado nasal y recuperando 51 aislamientos de *P. multocida* que representan un 28%. Un porcentaje menor al encontrado por Orea en el 2011, quien obtuvo un total de 56 muestras y logró aislar un 44%, aunque dicho autor muestreó 6 explotaciones.

Otros autores como Tayeb (2004), Ferreira (2012) y Deeb (1990) encontraron un 7, 20 y 31% de aislamientos en conejos, respectivamente, lo que muestra una gran variación de porcentajes cuando se trató de muestras de exudado nasal. Autores que aislaron *P. multocida* directo de órganos con lesiones, aunque en otras especies animales como en bovinos obtuvieron porcentajes de 34% (Pijoan et al., 1999) y en caprinos 35% (Blanco et al., 1993) de éxito, lo que puede mostrar que este método de aislamiento es más eficiente ya que se toman las muestras directamente de sitios con lesiones macroscópicas.

En México, se conoce también el estudio de Soriano en el 2012 en el cual informó 24 aislamientos en conejos con enfermedades respiratorias, aunque no menciona el número de animales muestreados. Existen diversos trabajos en conejos que no refieren el número de animales muestreados, por lo que se desconoce el porcentaje de aislamientos de *P. multocida* (Al-Haddawi et al., 1999; Stahel et al., 2009; Jaglic et al., 2004; Sanz, 2014).

En el presente trabajo se encontró que el tipo capsular A de *P. multocida* fue el más aislado (84%) con respecto al tipo D (2%). Aunque este porcentaje es variable en los diferentes países en los que se tiene informes de que el tipo capsular A ha sido más comúnmente aislado. Por ejemplo, en Estados Unidos (El-Tayeb et al., 2004), Malasia (Arumugam et al., 2011) y Brasil (Ferreira et al., 2012), con la excepción de Alemania se informa de una proporción similar de ambos tipos capsulares (Ewers et al., 2006).

Una investigación realizada en 1983 en Texas mostró que el porcentaje de tipo capsular A en conejos clínicamente enfermos fue de 92% (102/111) mientras que el tipo capsular D se encontró en un 8%, en Michigan informaron un 67% de tipo A, en ambos estudios utilizaron las pruebas de hialuronidasa y floculación por acriflavina respectivamente (Lu et al., 1983; 1983), aunque este tipo de pruebas pueden ser subjetivas, no difieren de los resultados obtenidos a partir del 2001 con la PCR Múltiple para tipos capsulares de *P. multocida* desarrollada por Townsend y que ha sido utilizada en estudios recientes (García, 2010; Orea, 2011; Soriano et al., 2012; Villegas et al., 2013).

En México solo se conocían informes del tipo capsular A en conejos (Orea, 2011; Soriano et al., 2012) pero esto puede deberse al poco número de estudios hechos referentes a esta especie, al poco número de animales muestreados y regiones geográficas muestreadas. Nuevos estudios podrían dar a conocer más aislamientos de *P. multocida* tipo D en otros estados, aunque es de esperarse que el tipo A siga siendo el predominante.

En el presente estudio se obtuvo solo un aislamiento de tipo capsular D, el cual es el primero que se informa que fue identificado en conejos de México, dicho aislamiento fue obtenido de un conejo para mascota de la raza cabeza de león en el estado de Morelos. Un 14% de los aislamientos obtenidos y que inicialmente habían sido caracterizados e identificados como *P. multocida* por pruebas bioquímicas, no amplificaron para los tipos capsulares A y D, lo que podría indicar la posibilidad de contar con la presencia de tipo capsular F que ya ha sido informado su aislamiento en conejos en países como República Checa (Jaglic et al., 2004) y España (García-Álvarez et al., 2015).

La bacterina fue elaborada en base a los requisitos de la 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. Se realizó prueba de pureza para verificar que las bacterias estaban completas y capsuladas. La prueba de esterilidad se realizó para verificar la ausencia de crecimiento de cualquier bacteria u hongo contaminante en medio de agar sangre. Para la prueba de inactivación se utilizó formaldehído al 0.2%.

A pesar de los avances en cuanto a vacunas, se optó por una bacterina ya que se ha demostrado que el nivel de protección que brindan es alto y los costos de producción son bajos. Estas consideraciones son de gran importancia ya que el sector cunícola en México aún no es fuerte económicamente y un biológico con un alto costo no sería accesible.

Como adyuvante se utilizó hidróxido de aluminio. Otros autores han utilizado diferentes sustancias como adyuvante oleoso (Verma y Jaiswal, 1998), saponinas (Kumar et al., 2012) y propoleo (Nassar et al., 2011) obteniendo buenos resultados, pero el presente trabajo se apegó a los requisitos de la NOM-049-ZOO-1995.

El tipo capsular que se utilizó para la elaboración de los inmunógenos se debió a los resultados obtenidos durante el muestreo, siendo la mayoría tipo A, se optó por usar solo este. Futuros trabajos podrían considerar incluir el tipo D si este es encontrado con mayor frecuencia en esta especie. Se conoce un trabajo en el que se utilizó una bacterina toxoide para porcinos, la cual confirió protección al desafío experimental homólogo en conejos (Suckow et al., 2008).

La vía de desafío utilizada fue la intranasal ya que se trató de simular una exposición natural al agente. Esta vía fue utilizada en varios trabajos (Jarvinen et al., 1998; Lu et al., 1981; Pratner et al., 1990) aunque con dosis de desafío mayores a la utilizada en el presente trabajo. Esta vía puede ser más efectiva ya que se evita que el animal degluta la suspensión o sea eliminada a causa de tos o estornudos. Aunque la vía intratraqueal pudiera ser más efectiva para asegurar la llegada del agente a pulmones, tiene el inconveniente de ser más difícil de utilizar, ya que requiere práctica para asegurar que la suspensión sea depositada en el sitio correcto. Es de importancia utilizar la vía intratraqueal en nuevos trabajos además de garantizar una dosis mayor al desafío.

La cepa utilizada para el desafío se obtuvo durante los muestreos en una granja con un número alto de animales enfermos, sin embargo, puede ser que no fuera una cepa muy virulenta o que la virulencia haya disminuido por el proceso de preservación que tuvo durante 6 meses. No existe mucha información sobre el tipo de cepa utilizada en desafíos. Pratner (1990) solo menciona haber utilizado un aislamiento virulento, otro

autor solo hace mención a una cepa de campo (Lu et al., 1981) y el resto no mencionó de donde obtuvieron la cepa (Jarvinen et al., 1998; Nassar et al., 2011; Ringler et al., 1985).

El grupo inoculado con el sobrenadante no mostró resultados significativos con respecto a la presencia de signos clínicos en la prueba de  $X^2$ , aunque ningún animal de este grupo mostró signos clínicos, los resultados pueden indicar que hace falta un número de animales más grande en los grupos para lograr validez estadística, aunque estudios hechos por otros autores (Uchida et al., 2003; Guadarrama et al., 2010) mostraron que el sobrenadante de *P. multocida* fue suficiente para inducir protección ante el desafío, ambos autores usaron una cantidad mayor de animales por grupo.

El resultado anterior puede ser consecuencia de una dosis insuficiente ante el desafío. Resulta de importancia mencionar que además del agente etiológico, existen condiciones que pueden propiciar a que se presente el cuadro de pasteurelisis pulmonar; como el estrés, la mala ventilación y una deficiente nutrición. Condiciones que no fueron reproducidas en este trabajo de investigación.

El grupo inoculado con la bacterina completa mostró resultados significativos cuando no hubo crecimiento bacteriano obtenido de los pulmones (Cuadro 4), similar a los resultados obtenidos por otros autores (Mukkur, 1979; Guadarrama et al., 2010) que utilizaron una dosis de desafío cercana a la utilizada en el presente trabajo; aunque el número tan bajo de conejos muertos durante el desafío pertenecientes al grupo testigo nos podría indicar que esta dosis no fue lo suficientemente alta y que la vía de inoculación no fue la adecuada para este desafío ya que no se pudo garantizar que el contenido bacteriano llegara a pulmones. El grupo inoculado con el sobrenadante y el grupo testigo no mostraron resultados significativos cuando no hubo crecimiento bacteriano.

La cantidad de crecimiento bacteriano aislado a partir de pulmones después del desafío se utilizó para medir el grado de protección de ambos inmunógenos. Los criterios utilizados fueron: no hubo, poco y abundante, similar al trabajo de Shih en 2009 quien utilizó una escala nominal para definir el nivel de lesión en casos de rinitis atrófica. En el grupo inmunizado con la bacterina completa no hubo crecimiento en la mayoría (8/10

conejos) de los aislamientos, en el grupo inmunizado con el sobrenadante mostraron que no hubo crecimiento (4/19) o que hubo poco crecimiento (6/10), a diferencia del grupo testigo en el que la mayoría de los conejos mostró abundante crecimiento bacteriano (8/10).

## 8. Conclusiones

- Se ha conseguido conocer que el tipo capsular A de *P. multocida* es el predominante en conejos en los estados muestreados. Resultado similar a lo descrito en la mayoría de países.
- Aunque los métodos convencionales para la identificación de *P. multocida* siguen siendo utilizados, es de gran importancia utilizar los métodos moleculares como PCR para mayor precisión.
- Se debe aumentar la dosis de desafío y el número de animales por grupo a fin de obtener resultados más claros.

## **Anexos**

### **1. Preparación de frotis fijos**

Los diversos procesos de tinción, en su mayoría, requieren de un frotis fijo a partir de muestras clínicas o de un cultivo de donde se sospecha la presencia de bacterias o levaduras patógenas. En el caso de los cultivos, éstos deben ser recientes para tener las propiedades adecuadas de las estructuras de los microorganismos. La mayoría de los frotis se fijan con calor, para permitir la adhesión del microorganismo a la superficie de la laminilla.

#### **Método de preparación.**

- En un portaobjetos limpio, marque con lápiz grueso donde colocará la muestra del cultivo.
- Con ayuda de un asa microbiológica, colocar una gota de agua destilada en el área marcada de la laminilla.
- Esterilizar con calor (rojo vivo) el esa microbiológica, dejar enfriar, tomar una colonia el cultivo y mezclarla con la gota de agua destilada.
- Secar las laminillas a temperatura ambiente. Pasar la laminilla tres veces por la llama del mechero con el frotis extendido hacia arriba.

### **2. Tinción de Gram**

La tinción de Gram se aplica universalmente como primer paso en la identificación de las bacterias y levaduras. Este método divide en dos grupos: grampositivas y gramnegativas; de acuerdo con los componentes predominantes de la pared celular, es posible la observación microscópica de la morfología (cocos, bacilos), el tamaño y la agrupación (cadenas, racimos).

El procedimiento se inicia al colorear a los microorganismos con cristal violeta (colorante primario), se adiciona una solución de bicarbonato junto con un colorante primario que actúa únicamente como catalizador de la reacción, y posteriormente añadir una solución débil de yodo (mordente); éstos se combinan con algunos componentes del microorganismo y son retenidos por la pared celular. Posteriormente, cuando se trata con alcohol acetona (decolorante), la pared de las bacterias grampositivas, se deshidrata, lo que impide la salida del colorante primario. En el caso de las bacterias gramnegativas, el agente decolorante destruye la integridad de la membrana externa, lo que permite la salida del colorante primario. En consecuencia, la fuscina básica o safranina (colorante de contraste) es incapaz de penetrar en la pared del primer grupo (grampositivas), pero si se incorpora en la célula del segundo grupo (gramnegativas).

Por lo tanto, los microorganismos que conserven el colorante primario se observaran de color azul o morado, denominándose grampositivos, y las bacterias que no lo hacen mostraran un color rosa o rojo, denominándose bacterias gramnegativas.

### **Procedimiento para la realización de la tinción de Gram.**

- En un frotis fijo, depositar una gota del colorante primario y una gota de solución de bicarbonato de sodio. Dejar actuar durante 15 segundos.
- Lavar con unas gotas de agua.
- Cubrir la solución con un mordente, dejar actuar 15 segundos. Lavar con agua.
- Cubrir con la solución decolorante, dejar actuar de 3 a 5 segundos y lavar con agua.
- Cubrir con el colorante secundario, dejar actuar por 15 segundos, lavar con agua y secar con papel absorbente. Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).

### **3. Prueba de Citrato de Simmon**

#### **Aplicación.**

Esta prueba es útil para diferenciar *Enterobacter* y *Klebsiella* (generalmente positivos) de *Escherichia coli* (negativa).

#### **Objetivo.**

Determinar la capacidad bacteriana para utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono.

#### **Medios y reactivos.**

Se utiliza un agar que contiene 0.2 de citrato de sodio, al cual se le adiciona un indicador de pH (azul de bromotimol). Se envasa en tubo con superficie inclinada.

#### **Mecanismo.**

Las bacterias al utilizar el citrato liberan residuos de sodio que al unirse con radicales OH alcalinizan el medio. Bajo estas condiciones el indicador de pH cambia de color verde a color azul.

#### **Método de siembra.**

El medio se siembra por estría.

#### **Incubación.**

Se realiza a 37°C durante 24 a 48 horas; en ocasiones es necesario prolongar este periodo hasta 7 días antes de considerar que la reacción es negativa.

#### **Interpretación de resultados.**

Prueba positiva: cambio del medio a color azul

Prueba negativa: el medio permanece verde.

## **4. Prueba de indol**

### **Aplicación.**

Diferenciar a *Escherichia coli* y *Klebsiella*, y a *Proteus mirabilis* de otras especies de *Proteus*.

### **Objetivo.**

Determinar la habilidad de la bacteria para producir triptofanasa y oxidar el triptófano con producción de indol.

### **Medios y reactivos.**

Se utiliza el medio SIM, al cual, después del desarrollo bacteriano, se le agrega el reactivo de Kovac (150 ml de alcohol isoamílico, amílico o butírico con 10 g de p-dimetil amino benzaldehído, a los que se le adicionan 50 ml de ácido clorhídrico concentrado).

### **Mecanismo.**

La triptofanasa hidroliza el triptófano con la liberación de anillos indólicos. La adición del reactivo de Kovac detecta estos anillos indólicos libres y por lo tanto, indirectamente la producción de la enzima triptofanasa por parte de la bacteria.

### **Método de siembra.**

Inocular en el medio SIM por picadura con asa recta (2/3 partes del tubo) e incubar de 24 a 48 horas a 37°C.

### **Interpretación de resultados.**

Agregar al tubo de SIM dos gotas del reactivo.

Prueba positiva: anillo rojo en la superficie.

Prueba negativa. Anillo de cualquier otro color en la superficie.

## **5. Prueba de triple azúcar hierro (TSI)**

### **Aplicación.**

Prueba para diferenciar entre géneros de bacilos gramnegativos entéricos y otras bacterias.

### **Objetivo.**

Determinar la capacidad para utilizar azúcares, producción de ácido sulfhídrico y producción de gas por fermentación.

### **Medios y reactivos.**

El medio de TSI contiene agar, peptonas y sales minerales; tres azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa), tiosulfato de sodio, sulfato ferroso y rojo de fenol como indicador de pH.

### **Mecanismo.**

Es una prueba donde se pueden apreciar tres resultados:

Utilización de azúcares. El medio contiene lactosa, sacarosa, carbohidratos que pueden ser utilizados mediante oxidación con la producción de ácido. Los cambios de pH son detectados por el rojo de fenol, dando amarillo con un pH ácido, y rojo con un pH alcalino.

Producción de gas. Hay microorganismos que producen gas como resultado de la fermentación de algunos carbohidratos.

Esta reacción se observa en el medio por la presencia de huecos, burbujas en el agar o incluso el desplazamiento del agar en el tubo por acción del gas que lo empuja.

Producción de ácido sulfhídrico. Algunas bacterias pueden reducir el tiosulfato de sodio a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con el sulfato ferroso del medio produciendo sulfuro de hierro. Esto se observa en el medio como un precipitado de color negro. La combinación de estas tres reacciones da lugar a seis lecturas posibles.

### **Método de siembra.**

Por picadura en el fondo del tubo y estría continua en la superficie, el inóculo debe ser abundante. El tapón del tubo debe quedar ligeramente flojo para facilitar la eliminación del gas producido.

### **Incubación.**

Desde 18 y hasta 24 horas como máximo. El prolongar la incubación puede dar lugar a lecturas falsas, ya que algunas reacciones pueden revertirse.

Cuando no existe un buen crecimiento tanto en el fondo como en la superficie, los resultados deben tomarse con reserva.

### **Interpretación de resultados.**

	1	2	3	4	5	6
Superficie	A	R	R	A	R	A
Fondo	A	A	A	A	R	A
Gas	+	+	V	V	-	-
H <sub>2</sub> O	-	+	-	+	-	-

A= amarillo (acidez), R= rojo (alcalinidad), V= variable

La reacción 6 corresponde a *Pasteurella multocida*.

## **6. Prueba de urea**

### **Aplicación.**

Para diferenciar entre especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Para diferenciar *Proteus* de otros géneros. Útil para la diferenciación rápida de *Pasteurella ureae*, *Corynebacterium renale* y *Brucella* spp.

### **Objetivo.**

Determinar la habilidad de las bacterias para producir la enzima ureasa que desdobla la urea en amoníaco.

### **Medios y reactivos.**

Medio sólido con base peptonada, glucosa y minerales; contiene urea y rojo de fenol como indicador de pH.

### **Mecanismo.**

Algunas bacterias poseen la capacidad de reducir la urea hasta amoníaco, gracias a la enzima ureasa. El amoníaco, a su vez, se combina con el agua y forma hidróxido de amonio (alcalino)

La presencia de hidróxido de amonio se detecta mediante un cambio de color por el indicador de pH.

### **Método de siembra.**

Inocular densamente la superficie del medio por una estría continua.

### **Incubación.**

De 1 a 7 días a 37°C.

### **Interpretación de resultados.**

Prueba positiva: rosa intenso

Prueba negativa: son cambio en el medio.

## **7. Prueba de oxidasa (Método de Kovacs)**

### **Aplicación.**

Prueba auxiliar en la identificación de *Neisseria*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Pseudomonas* y *enterobacterias*. Debe realizarse a todos los bacilos gramnegativos.

### **Objetivo.**

Determinar la producción de la enzima citocromo oxidasa (indofenol oxidasa).

### **Medios y reactivos.**

Se impregna un trozo de papel filtro con 2 a 3 gotas de solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil p-fenil-diamina. No dejar que el papel seque completamente.

### **Mecanismo.**

Las bacterias que producen oxidasa son capaces de oxidar el reactivo, con la consecuente aparición de color.

### **Interpretación de resultados.**

Utilizando un asa de vidrio tomar colonias del microorganismo a probar. Frotar las colonias sobre la superficie del papel filtro.

La aparición de un color purpura intenso en 10 segundos indica una prueba positiva. Las reacciones tardías deben ser ignoradas. Una prueba negativa estará indicada por cualquier otro color o ausencia de color.

## Literatura citada.

Ahmad TA, Rammah SS, Sheweita SA, Haroun M y El-Sayed LH. Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. *Vaccine*. 2014. 32, 909– 917

Al-Haddawi M.H, Radu S.J, Mutalib A.R, Bahaman A.R, Zamri-Saad M. Sheikh-Omar A.R. Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1999, 45, 269–275.

Anastasio ME, Zavaleta MR, Jimenez VJ, Negrete AE, Vázquez CC y Sanchez AP. Desarrollo de herramientas para la identificación molecular de *Pasteurella multocida*. XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. 2006.

ANCUM ([www.ancum.org.mx](http://www.ancum.org.mx)). Página oficial de la Asociación Nacional de Cunicultores de México A.C.

Arumugam N.D, Ajam N, Blackall P.J, Asiah N.M, Ramlan M, Maria J, Yuslan S, Thong K.L. Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts - a comparison of phenotypic and genotypic methods. *Trop Biomed.* 2011, 28, 55-63.

Astorga R, Maldonado A, Arenas A, Tarradas C, Luque I y Perea A. La pasteurelisis del conejo. Córdoba: Lagomorpha, 1997. 94, 33-38.

Avakian AP, Dick JW and Derieux WT. Fowl Cholera Immunity Induced by Various Vaccines in Broiler Minibreeder Chickens Determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Avian Diseases.* 1989. 33, 97-102.

Badiola SJL. Patología por *Pasteurella multocida* (Conferencia) XVII Simposium de cunicultura. Salamanca, 1992.

Bhave Sa and Guy LM. *Pasteurella multocida* meningitis in an infant with recovery. *British Medical Journal.* 1977. 741-742

Biberstein, E. L., Jang, S. S., Kass, P. H., y Hirsh, D. C. Distribution of indoleproducing urease-negative pasteurellas in animals. J. Vet.Diagn. Invest. 1991 3, 319- 323.

Blanco-Viera, F.J., Trigo, F.J., Jaramillo-Meza, L., Aguilar-Romero F., Tapia-Pérez, G. and Suárez-Güemes, F. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Veterinaria México*, 1993. 24, 107–112

Boyce JD, Adler B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun* 2000. 68,3463-3468.

Boyce JD, Chung JY y Adler B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J Biotechnology*. -2000. -83. 153-160.

Boyce JD, Lo CYR y Adler B. *Pasteurella* and *Manheimia*. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ed. CL Gyles. – Iowa USA. 2004. - 3ª ed. 273-294.

Brown J, Dawe D. L, Davis R. B, Foster J. W, Srivastava K. K. Fowl Cholera Immunization in Turkeys. *Applied Microbiology*. 1970. 5, 837-841.

Busch C, Orth J, Djouder N, Aktories K. Biological activity of a C-terminal fragment of *Pasteurella multocida* toxin. *Infect Immun*. 2001. 69,3628–3634.

Campuzano O. V, Gonzalez R. A, Hernandez C. R, Suarez G. F, Trigo T. F, Jaramillo A. C. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de exudado nasal de bovinos, en dos cuencas lecheras de México. *Veterinaria México*. 2011.

Capitini CM, Herrero IA, Patel R, Ishitani MB and Boyce Thomas. Wound Infection with *Neisseria weaver* and a Novel Subspecies of *Pasteurella multocida* in a Child Who Sustained a Tiger Bite. *Clin Infect Dis*. 2002. 34, e74–e76.

Cardenas PM, Cruz LO, Gándara RJ y Pérez HM. Factores de virulencia bacteriana: la inteligencia de las bacterias. *Elementos*. 2014, 94, pp. 35-43.

Carrillo LM. Utilización de lectinas en la inhibición de la adhesión de *Pasteurella multocida*. Rev. Med. Vet. 2013, 93-107.

Carter GR y Rundell SW. Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. Vet Rec. 1975. 12, 345.

Carter GR y Subronto P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* whit acriflavine. J Vet Res. 1973. 29-30.

Carter GR. Simplified identification of somatic varieties of *Pasteurella multocida* causing fowl cholera. Avian Dis. 1972. 16, 1109-14.

Carter GR. Studies on *Pasteurella multocida*: a haemagglutination test for the identification of serological types. American Journal of Veterinary Research. 1955. 481-484.

Chen HI, Hulten K, Clarridge JE. Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate whit clinical presentation. J. Clin. Microbiol. 2002. 40, 3438.

Chengappa MM, Carter GR y Bailie WE. Identification of type D *Pasteurella multocida* by counter immunoelectrophoresis. J Clin Microbiol. 1986. 24, 721-723.

Chengappa MM, Myers RC y Carter GR. Capsular and somatic types of *Pasteurella multocida* from rabbits. Can J Comp Med. 1982. 46. 437-439.

Christensen H, Bertelsen MF, Bojesen AM and Bisgaard M. Classification of *Pasteurella* species B as *Pasteurella oralis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2012, 62, 1396–1401.

Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghoddusi M and Adler B. Role of capsule in pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogrup A. Infect Immun. 2001. 69. 2487-2492.

Colin R. L., Jaramillo M. F y Aguilar R. F. Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos ovinos en México. Latinoam Microbiol. 1987. 29, 231-234.

DeAngelis PL, Gunay NS, Toida T, Mao W, Linhardt RJ. Identification of the capsular polysaccharides of type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin respectively. 2002. 337, 1547–1552.

Deeb BJ y DiGiacomo RF. Respiratory diseases of rabbits. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2000. 3,465-80.

Deeb BJ, DiGiacomo RF, Bernard BL and Silbernagel SM. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infection in rabbits. Journal of Clinical Microbiology. 1990. 70-75.

Dees Sb, Powell J, Moss CW, Hollis DG and Weaver RE. Cellular Fatty Acid Composition of Organisms Frequently Associated with Human Infections Resulting from Dog Bites: *Pasteurella multocida* and Groups EF-4, IJj, M-5, and DF-2. Journal Of Clinical Microbiology, Dec. 1981. 612-616.

Digiacomio RF, Jones CD y Wathes CM. Transmission of *Pasteurella multocida* in rabbits. Lab Anim Sci. 1987. 37, 621-623.

Doughty, S. W., Ruffolo, C. G., y Adler, B. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. Vet.Microbiol. 2000. 72, 79-90.

Dyavolova M, Yanchev I, Gudev D y Moneva P. Effect of high ammonia level on stress-induced hematological changes in rabbits: preventive effect of pyridoxine. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2013. 19, 828-834.

El Tayeb, A.B., Morishita, T.Y. and Angrick, E.J. Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping, and restriction endonuclease analysis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2004. 16, 121–125.

Ewers, C., Lubke-Becker, A., Bethe, A., Kiessling, S., Filter, M., y Wieler, L. H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet.Microbiol. 2006. 304-17.

Fernandez de Henestrosa AR, Badiola I, Saco M, Perez de Rozas AM, Campoy S, Barbe J. Importance of the galE gene on the virulence of *Pasteurella multocida*. FEMS Microbiol Lett. 2007. 154, 311-316.

Fernandez RM, Vaca R, Reyes LM, de la Garza M, Aguilar RF, Zenteno E, Soriano VE y Negrete AE. Outer membrane vesicles of *Pasteurella multocida* contain virulence factors. MicrobiologyOpen. 2014. 3, 711–717.

Ferreira T. S, Felizardo M.R, de Gobbi D.D, Gomes C.R, de Lima P.H, Moreno M, Paix R, Perreira J.J, Moreno A.M. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Rabbits in Brazil. The Scientific World Journal. 2012. 2012, 6 pages.

Flatt RE, Deyoung DW y Hogle RM. Suppurative otitis media in the rabbit: prevalence, pathology and microbiology. Lab Anim Sci. 1977. 27, 347-347.

Gaillot O, Lemenand O, Marceau M And Simonet M. Proposed reclassification of *Pasteurella lymphangitidis* Sneath & Stevens 1990 as *Yersinia pseudotuberculosis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013. 63, 3927–3929.

García NB. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, 2010.

García-Alvarez A, Chaves F, Fernandez A, Sanz C, Borobia M, and Cid D. An ST11 clone of *Pasteurella multocida*, widely spread among farmed rabbits in the Iberian Peninsula, demonstrates respiratory niche association. Infect Genet Evol. 2015. 81-7.

Gong Q, Cheng M, Niu M. Out membrane protein DNA vaccines for protective immunity against virulent avian *Pasteurella multocida* in chickens. Proc Environ Sci, 2011. 8, 723–729.

Gong Q, Qu N, Niu M, Qin C, Cheng M, Sun X, et al. Immune responses and protective efficacy of a novel DNA vaccine encoding outer membrane protein of avian *Pasteurella multocida*. *Vet Immunol Immunopathol* 2013. 152, 317–324.

González-Hachero J. Clasificación de las Vacunas. Asociación Española de Vacunología. 2005.

Guadarrama CG, Lemuel LL, Alonso FM, Montes de Oca JR, Fernandez RP. Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de antígenos de *Pasteurella multocida*, obtenidos de aislados de casos clínicos. *Vet. Méx.* 2010. 41.

Gutierrez PJA. Bacilos gram negativos asociados al aparato respiratorio. Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias. Inmunología Depto de microbiología. FMVZ-UNAM, 2010.

Hanan MS, Riad EM y el-Khouly NA. Antibacterial efficacy and pharmacokinetic studies of ciprofloxacin on *Pasteurella multocida* infected rabbits. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2000. 107, 151-155.

Harper M, Cox AD, Adler B, Boyce JD. *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide: The long and the short of it. *Veterinary Microbiology* 153. 2011. 109–115.

Harper Marina, Boyce John D y Adler Ben. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett*. ed. Societies Federation of European Microbiological. Blackwell Publishing Ltd.2006, 265. 1-10.

Heckels JE. Structure and Function of Pili of Pathogenic *Neisseria* Species. *Clinical Microbiology Reviews.* 1989, 66-73.

Heddleston KL, Rebers PA and Wessman G. Fowl Cholera: Immunologic and Serologic Response in Turkeys to Live *Pasteurella multocida* Vaccine Administered in the Drinking Water. *Poultry Science.* 1975. 54, 217–21.

Heddleston KL, Watko LP & Rebers PA. Dissociation of a fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 8: 1964. 649–657.

Hunt ML, Adler B y Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol. 2000. 72, 3-25.

Isaacson RE and Trigo E. Pili of *Pasteurella multocida* of porcine origin. FEMS Microbiol.Lett. 1995. 132, 247-251.

Jacques M, Bélanger M, Diarra MS, Dargis M, Malouin F. Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron restricted conditions and in vivo. Microbiology. 1994. 140, 263–27.

Jacques M, Kobisch M, Bélanger M y Dugal F. Virulence of Capsulated and Noncapsulated Isolates of *Pasteurella multocida* and Their Adherence to Porcine Respiratory Tract Cells and Mucus. Infection and Immunity. 1993. 4785-4792.

Jacques M. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. Trends in Microbiology. 1996. 4, 408–410.

Jaglic Z, Jeklova E, Leva L, Kumer V, Kucerova Z, Faldyna M, Maskova J and Alexa P. Experimental study of pathogenicity of *Pastuerella multocida* serofrup F in rabbits. Vet Microbiol. 2008. 126, 168-177.

Jaglic Z, Kucerova Z, Nedbalcova K, Hlozek P and Bartos M. Identification of *Pasteurella multocida* Serogroup F isolates in rabbits. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2004. 467-9

Jarvinen LZ, Hogenesch H, Suckow MA and Bowersock TL. Induction of Protective Immunity in Rabbits by Coadministration of Inactivated *Pasteurella multocida* Toxin and Potassium Thiocyanate Extract. Infection And Immunity. 1998. 3788–3795.

Jarvinen LZ, HogenEsch H, Suckow MA and Bowersock TL. Intranasal Vaccination of New Zealand White Rabbits Against Pasteurellosis, Using Alginate-Encapsulated *Pasteurella multocida* Toxin and Potassium Thiocyanate Extract. Comparative Medicine. 2000. 50, 263-269.

Kloseek JM, Dufour X, Desmons-Grohler C y Fontanel JP. Fisiología de la mucosa respiratoria nasal y trastornos funcionales. Elsevier. 2000.

Kumar S, Chaturvedi VK, Kumar B, Kumar P, Somarajan SR, Kumar A, Yadav AS and Sharma B. Improved Humoral Immune Response Of Oil Adjuvant Vaccine By Saponin Coadjuvantation Against Haemorrhagic Septicaemia In Mice And Buffalo Calves. The Indian Journal Of Animals Sciences. 2012. 82.

Ledermann W. Una historia personal de las bacterias. Ril Editores, Chile. 2007. 237.

Lu Yue-Shoung, Pakes SP y Stefanu C. Capsular and somatic serotypes of *Pasteurella multocida* isolates recovered from healthy and diseased rabbits in Texas. J Clin Microbiology. 1983. 292-295.

Macfadyen, A. Über ein Toxin des Bacillus suisepiticus. Ed. Jena: Gustav Fischer, 1907.

Manning, P.J. Naturally occurring pasteurellosis in laboratory rabbits: chemical and serological studies on whole cell and lipopolysaccharides of *Pasteurella multocida*. Infect. Immun. 1984. 44, 502-507.

Martin-Crespo MC y Salamanca CA. El muestreo en la investigación cualitativa. 2007.

Martinez PI, Sosa TI, Lugo MS, Hernandez RA y Castillo RR. Análisis de la situación epidemiológica en una colonia de producción intensiva de conejos para la experimentación entre 1993 e 2007. Redvet. 2010. 11.

Matsumoto M and Strain JG. Pathogenicity of *Pasteurella multocida*: its variable nature demonstrated by in vivo passages. Avian Dis. 1993. 37, 781-5.

McKay SG, Morck DW, Merrill JK, Olson ME, Chan SC y PAp Km. Use of tilmicosin for treatment of pasteurellosis in rabbits. Am J Vet Res. 1996. 57, 1180-4.

Mota-Sánchez J. Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria. Salud Pública Méx. 2009. 5, 463-469.

Mukkur TKS. Immunogenicity of a Chaotropically Extracted Protective Antigen(s) of *Pasteurella multocida* Type A (Bovine Origin) Against Experimental Pasteurellosis in Mice. Journal of General Microbiology. 1979. 113, 37-43.

Nassar SA, Mohamed AH, Soufy H, Nasr SM and Mahran KM. Immunostimulant Effect of Egyptian Propolis in Rabbits. The Scientific World Journal. 2012. 9 pages.

Nielsen JP, Biasgaard M, Pedersen KB. Production of toxin in strains previously classified as *Pasteurella multocida*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B. 1986, 94(3):203-4.

Okerman L, Devriese LA, Gevaert D, Uyttendaele E y Haesebrouck F. In vivo activity of orally administered antibiotics and chemotherapeutics against acute septicaemic pasteurellosis in rabbits. Lab Anim. 1990. 24, 341-4.

Okewole EA y Olubunmi PA. Antibigrams of pathogenic bacteria isolated from laboratory rabbits in Ibadan, Nigeria. Laboratory Animals. 2008. 42, 511-514.

Ophir T y Gitnick DL. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. Appl Environment Microbiol. 1994. 60, 740-745.

Orea A. Caracterización de tipos capsulares de *Pasteurella multocida* obtenidos de conejos en el estado de Puebla, Mexico. 2011

Palócz O, Gál J, Clayton P, Dinya Z, Juhász C y Csikó G. Alternative treatment of serious and mild *Pasteurella multocida* infection in New Zealand White rabbits. BMC Vet Res. 2014. 25, 276.

Pandit KK and Smith JE. Capsular hialuronic acid in *Pasteurella multocida* type A and its counterpart in type D. Res Vet Sci. 1993. 54, 20-24.

Pasteur L. Summary Report of the Experiments Conducted at Pouilly-le-Fort, Near Melun, on the Anthrax Vaccination. Comptes Rendus de l'Academie des Science. 1881. 92, 1378-1383.

Perersen SK and Foged NT. Cloning and Expression of the *Pasteurella multocida* Toxin Gene, *toxA*, in *Escherichia coli*. Infection And Immunity, 1989. 3907-3913

Petersen SK, Foged NT, Bording A, Nielsen JP, Riemann HK, Frandsen PL. Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. Infect Immun. 1991. 59, 1387-93.

Pijoan C y Trigo F. Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. Can J Vet Res. 1990. 54, 16-21.

Pijoan J and Ochoa G. Interaction between a hog cholera vaccine strain and *Pasteurella multocida* in the production of porcine pneumonia. J Comp Pathol. 1978. 88, 167-70.

Pijoan, Aguadé, Pau; Aguilar, Romero, Francisco; Morales, Alvarez, J. Francisco. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. Veterinaria México. 1999. 149-155.

Pratner MM, Harmon BG, Glisson JR and Mahaffey EA. Septicemia in Vaccinated and Nonvaccinated Turkeys Inoculated with *Pasteurella multocida* Serotype A: 3,4. Vet Path. 1990. 254-260.

Pullinger G. D, Bevir T, Lax A. J. The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. Mol Microbiol. 2004. 51, 255-269.

Quinn, P. J, Carter, M. E, Markey, B., y Carter, G. R. *Pasteurella* species. In Clinical Veterinary Microbiolog. Mosby, Edimburg, Scotland.1999, 254-258.

Register KB, Sacco RE and Brockmeier SL. Immune response in mice and swine to DNA vaccines derived from the *Pasteurella multocida* toxin gene. Vaccine. 2007. 6118–6128.

Rimler RB, Register KB, Magyar T and Ackermann MR. Influence of chondroitinase on indirect hemagglutination titers and phagocytosis of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F. Vet Microbiol. 1995. 47, 287-94.

Rimler RB. Restriction endonuclease analysis using HhaI and HpaII to discriminate among group B *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia. J. Med. Microbiol. 2000. 49, 81-87.

Rimler, RB. Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerization with mucopolysaccharidases. Vet. Rec. 1994. 134,191–192.

Ringler DH, Peter GK, Chrisp CE and Keren DF. Protection of Rabbits against Experimental Pasteurellosis by Vaccination with a Potassium Thiocyanate Extract of *Pasteurella multocida*. Infection And Immunity, Sept. 1985. 498-504.

Roca T, Castellano J. A, Campo J. Tratado de cunicultura II. Real Escuela Oficial y Superior de Avicultura. Barcelona España. 1980, 413.

Romero HC. Exposición simultánea y secuencial al lipopolisacárido de *Pasteurella multocida* y a la bacteria en cultivos de fosa nasal de conejo. Universidad Nacional de Colombia, 2012.

Romero HS y Iregui CA. El lipopolisacárido. Rev. Med. Vet. 2010. 19, 37-45.

Rosell J.M. Capítulo nº 17. Pasteurellosis. En: Enfermedades del conejo. Rosell J.M., Badiola I., de la Fuente L.F., Cuervo L. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona, España 2000. 275-288.

Rosell JM. Enfermedades del aparato respiratorio del conejo en explotaciones intensivas. V Jornada de profesionales de la cunicultura. - Tortosa: 2003. 211-217.

Rosenbusch CT and Merchant IA. A Study Of The Hemorrhagic Septicemia Pasteurellae. Department of Veterinary Hygiene, Division of Veterinary Medicine, Iowa State College, Ames, Iowa. 1938.

Rosner H, Grimmecke HD, Knirel YA, and Shashkov AS. Hyaluronic acid and a (134)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. Carbohydr. Res. 1992. 223, 329– 333.

Sanz CT. Valoración de la protección conferida por diferentes vacunas frente a cepas de *Pasteurella multocida* aislada en conejo utilizando el modelo ratón. Zaragoza, España: Univ de Zaragoza, 2014.

Selva L, Viana D, Ortega J y Corpa JM. Pasteurelisis: principal patología respiratoria en cunicultura industrial. Boletín de Cunicultura. 2007, 150.

Shah NH, Biewenga J, Shah NH, de Graaf FK. Vacuolating cytotoxic activity of *Pasteurella multocida* causing haemorrhagic septicaemia in buffalo and cattle. FEMS Microbiology Letters 143. 1996. 97-101.

Singh S, Singh VP, Cheema PS, Sandey M, Ranjan R, Kumargupta S, et al. Immune response to dna vaccine expressing transferrin binding protein a gene of *Pasteurella multocida*. Braz J Microbiol 2011. 42, 750–60.

Soriano VE, Vega SV, Zamora E JL, Acosta DJ, Aguilar RF, Negrete AE. Identification of *Pasteurella multocida* capsular types isolated from rabbits and other domestic animals in Mexico with respiratory diseases. Tropical animal health and production. 2012. 44, 935-7

Stahel A.B, Hoop R. K, Kuhnert P, Korczak B.M. Phenotypic and genetic characterization of *Pasteurella multocida* and related isolates from rabbits in Switzerland. J Vet Diagn Invest. 2009. 21, 793–802.

Sterner-Kock, A., Lanske, B., Uberschar, S., y Atkinson, M. J. Effects of the *Pasteurella multocida* toxin on osteoblastic cells in vitro. Vet.Pathol. 1995, 32, 274-279.

Suckow MA, Haab RW, Miloscio LJ and Guilloud NB. Field Trial of a *Pasteurella multocida* Extract Vaccine in Rabbits. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2008. 47, 18-21.

Suckow MA. Immunization of rabbits against *Pasteurella multocida* using a commercial swine vaccine. *Laboratory Animals*. 2000. 34, 403-408.

Suckow MA. Protective immunity to *Pasteurella multocida* heat-labile toxin by intranasal immunization in rabbits. *Lab Anim Sci.* - Oct de 1995. 45, 526-532.

Tayeb ABE, Morishita TY, Angrick EJ. Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping and restriction endonuclease analysis. *J Vet Diagn Invest*. 2004. 16, 121-125.

Townsend KM, Boyce JD y Chung JY. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol.* - Mar de 2001. 924-929.

Trigo E y Pijoan C. Presence of pili in *Pasteurella multocida* strains associated with atrophic rhinitis. *Vet Rec*. 1988. 19.

Uchida C, Kimura Y, Kubota S, Sasaki O. Protective effect of *Pasteurella multocida* cell-free antigen and toxoid against challenge with toxigenic strains of *Pasteurella multocida* in mice. *J Vet Sci*. 2003. 65, 737-740.

Verma R and Jaiwal TN. Haemorrhagic septicaemia vaccines. *Vaccine*. 1998. 1184-92.

Villa A. Patología respiratoria en conejos de granja. *Veterinary Record.* - 2001. 788-790.

Villegas VA, Campuzano OV, Hernandez CR, Suarez GF, Trigo TF y Jaramillo AC. Caracterización de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos productores de carne clínicamente sanos en el estado de Querétaro. Número especial *Vet. Méx.*, 2014.

Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, Hooper DC. *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1984. 63, 133-54.

Webster Leslie T. The epidemiology of a rabbit respiratory infection: clinical, pathological and bacteriological study of snuffles. J. Exp. Med. Junio de 1924. 39, 843-856.

Wilkie I. W, Harper M, Boyce J. D and Adler B. *Pasteurella multocida*: Diseases and Pathogenesis en Klaus Aktories, Joachim H. C. Orth, Ben Adler. *Pasteurella multocida*: Molecular Biology, Toxins and Infection. Editorial Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.

Wilson BA and Ho M. *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology. Clinical Microbiology Reviews, 2013. 631– 655.