



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“Evaluación de un inmunógeno elaborado a base
microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica*
serotipo A2, de aplicación en ovinos
del Estado de México”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :
ANA LISSET NATIVITAS ESQUIVEL**

ASESORA:

DRA. CYNTHIA GONZÁLEZ RUÍZ

COASESORES:

M en C JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ

DRA. MARISELA LEAL HERNÁNDEZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2017.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

"Evaluación de un inmunógeno elaborado a base de microvesículas (MVs) de Mannheimia haemolytica serotipo A2, de aplicación en ovinos del Estado de México"

Que presenta la pasante: ANA LISSET NATIVITAS ESQUIVEL

Con número de cuenta: 30715435-4 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de marzo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatihu Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
SECRETARIO	Dra. Cynthia González Ruíz	
1er. SUPLENTE	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gerardo Arcila López Tello	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS.

A mi padre que gracias a sus desvelos, su dedicación y su tiempo he podido concluir hoy esta etapa de mi vida, el me enseñó lo valioso que es estudiar y quiero que sepa que este logro no solo es mío si no de ambos, me encuentro inmensamente feliz de que el este hoy conmigo para ver los frutos de su trabajo, quiero que sepa que a pesar de que no pueda verme físicamente siempre le estaré eternamente agradecida por darme la oportunidad tan grande de estudiar , te amo y siempre estaré contigo.

A mi madre que a pesar de las adversidades y las pruebas difíciles que nos ha puesto la vida ha sabido salir adelante , le agradezco ser mi pilar cuando creí que no podría más, te agradezco estar hoy aquí y sabes que no tengo palabras para decirte lo mucho que te amo, estoy orgullosa de ser tu hija.

A mi Juanito, a ti que has estado conmigo en los momentos más difíciles de mi vida, en esos momentos en los que creí que ya no había nada más que hacer, quiero darte las gracias por amarme y darme ánimos para no dejarme vencer gracias por enseñarme lo bonito que es la vida y que juntos podemos ser invencibles, gracias por soportar mis histerias durante toda la carrera, por tu paciencia y tu ayuda. Esto solo es el comienzo de algo maravilloso con lo cual quiero ir tomada de la mano contigo hasta el fin, eres mi amor completo.

A mí estimada DRA. Cynthia, gracias por darme esta gran oportunidad, por su paciencia y tiempo dedicado a este trabajo, por esperar tanto, sin usted no estaría hoy aquí muchísimas gracias le estaré eternamente agradecida.

A mi estimado amigo José Luis gracias por ser un gran amigo sabes que te quiero un montón y también tienes tu merito aquí.

A mis amigos, que me dieron grandes momentos a lo largo de estos años gracias.

A mi familia que a pesar de que no concordaban mucho con mi idea de ser médico veterinario siempre estuvieron ahí para apoyarme, gracias.

Por ultimo a mi querido mailo, que aunque ya no está conmigo fue mi mejor compañero y gracias a él me anime a cumplir mi sueño de la infancia, te amare siempre mi angelito.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
I. INTRODUCCIÓN	
I.1. Antecedentes generales de <i>Mannheimia haemolytica</i>	7
I.2. Reclasificación de <i>M. haemolytica</i>	7
I.3. Importancia económica de la mannheimiosis neumonica.....	9
I.4. Características de <i>Mannheimia haemolytica</i>	11
I.5. Factores de virulencia de <i>M. haemolytica</i>	13
I.5.1 Proteínas de membrana externa (PME).....	13
I.5.2 Lipopolisacárido (LPS).....	15
I.5.3 Leucotoxina (LKT).	16
I.5.4 Microvesículas (MVs).....	18
I.6. Microbiota del aparato respiratorio.....	23
I.7. Factores predisponentes para la presentación de la mannheimiosis.....	24
I.8. Cuadro clínico.....	26
I.9. Patogenia de la mannheimiosis neumónica.....	27
I.10. Lesiones pulmonares.....	28
I.10.1. Lesiones macroscópicas.....	28
I.10.2. Lesiones microscópicas.....	29
I.11. Diagnóstico.....	30
I.12. Prevención y control.	32
I. JUSTIFICACIÓN.....	37
II. HIPÓTESIS.....	38
III. OBJETIVO GENERAL	38
IV. OBJETIVOS PARTICULARES	38
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
V.1. Localización	39
V.2. Diseño experimental	39
V.3. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	40
VI.4. Obtención de microvesículas bacterianas (MVs)	40
VI.5. Corrimiento electroforético de proteínas membranales de Mvs de <i>M. haemolytica</i>	42
VI.6. Preparación del biológico vacunal	42

V.10. Aplicación del biológico vacunal de MVs.....	43
V.11. Colección y procesamiento de muestras (sangre y moco nasal).....	43
VI. TÉCNICA DE ELISA.....	44
VII. CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN.....	45
VIII. RESULTADO.....	46
VIII.1. Caracterización de antígenos en MVs.....	46
VIII.2. Ganancia diaria de peso	50
IX. DISCUSIÓN.....	51
X. CONCLUSIONES.....	62
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS,

Cuadro 1 .Cambios generales en la nomenclatura de <i>Mannheimia haemolytica</i>	9
Figura 1. Pérdidas en la producción ovina causadas principalmente por enfermedades respiratorias.....	10
Figura.2 Modelo de producción de MVs bacterianas. Se muestra la formación de una vesícula de una bacteria Gram negativa, la cual incluye membrana externa, así como material periplásmico, proteínas de membrana externa y lípidos, incluyendo PAMPs y otros factores de virulencia.	20
Figura 3. Bacteria Gram negativa no identificada encontrada en un biofilm de agua dulce en un río. Esta bacteria posee una microcápsula y libera una cantidad prodigiosa de MVs.....	23
Figura 4. Interrelación de los factores etiológicos, ambientales y propios del animal, que detonan la presentación de la enfermedad 8	25
Figura 5. Procedimiento para la obtención de MVs de <i>M. haemolytica</i> A1 y A2.....	41
Figura 6. Biológico vacunal (nanopartículas y MVs de <i>M. haemolytica</i>).....	43
Figura 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDSPAGE) al 12%, presencia de las diferentes proteínas acarreadas por las MVs de <i>M. haemolytica</i> . En el primer carril se observa el marcador de peso molecular estándar. En el segundo carril se corrió una alícuota que de MVs, en el cual se aprecian las proteínas de interés inmunogénico identificadas.....	46
Figura 8. Evaluación y comparación de los títulos de anticuerpos mediante ELISA INDIRECTA de IgM de los 3 grupos experimentales.....	47
Figura 9. Evaluación y comparación de los títulos de anticuerpos mediante ELISA INDIRECTA de IgG de los 3 grupos experimentales.....	48
Figura 10. Evaluación y comparación de los títulos de anticuerpos mediante ELISA INDIRECTA de IgA de los 3 grupos experimentales.....	49
Tabla 1. Calendario de tratamientos aplicado a los diferentes grupos de corderos. ...	45

Tabla 2. Promedio de ganancia diaria y total de peso de los 3 diferentes grupos de corderos evaluados	50
Tabla 3. Análisis de varianza.....	50

RESUMEN.

La neumonía en los rumiantes en general, es un padecimiento relevante y persistente, que afecta directamente al proceso productivo de las unidades de producción ovina en México. *Mannheimia haemolytica* es el agente bacteriano que comúnmente se asocia a dichos trastornos en esta especie. *M. haemolytica* secreta microvesículas (MVs) al medio, las cuales son estructuras que se forman a partir del plegamiento de la membrana externa de la bacteria, arrastrando constitutivamente, una gran cantidad de antígenos bacterianos de importancia para la bacteria. Dichas estructuras han sido evaluadas como inmunógeno (Título de patente No. 341611) en condiciones controladas, obteniéndose una protección del 100% de los animales vacunados con ésta, al ser administrada por vía intranasal y desafiados experimentalmente con cepas patógenas de campo. El objetivo de este trabajo, fue evaluar la aplicación del inmunógeno elaborado con microvesículas (MVs) de *M. haemolytica* A2, en condiciones de campo relacionándolo con la ganancia de peso, en corderos de Zumpango, Estado de México. Para tal efecto se utilizaron 60 corderos con tres semanas de edad, con un peso promedio de 8 kg, clínicamente sanos de las razas Romanov, Charollais y Suffolk. Los animales se ubicaron al azar en tres grupos, el grupo A, correspondió a animales vacunados por vía intranasal con MVs de *M. haemolytica* A2 y con nanopartículas de etilsianoacrilato y un tensoactivo (surfactante) como adyuvante; el grupo B fue vacunado por vía intramuscular con una vacuna comercial, y el grupo C correspondió al grupo testigo, a los cuales solo se les administró SSF por vía intramuscular e intranasal. Se realizaron muestreos de sangre para la obtención de suero, de todos los animales, dos veces por semana durante 12 semanas para la determinación de IgG e IgM, adicionalmente se les tomó un muestra de moco nasal mediante hisopo para la determinación de IgA. En la 5^o semana se les inmunizó por las vías antes señaladas y ocho días después recibieron una segunda inmunización. Los sueros y el moco nasal, se analizaron mediante ELISA Indirecta. Los animales vacunados con MVs de *M. haemolytica* A2, resultaron obtener altas concentraciones de IgA e IgG, con respecto al resto de los grupos evaluados, cabe mencionar que durante el experimento y posterior a la inmunización, murieron dos corderos de neumonía del grupo testigo y uno del grupo de vacunados con la vacuna experimental. Estos resultados sugieren que las MVs de *M. haemolytica* A2, son excelentes inmunógenos que inducen una respuesta inmune humoral, tanto de tipo local como sistémica, protegiendo a los animales del desarrollo de neumonía en campo.

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. Antecedentes generales de *Mannheimia haemolytica*.

La mannhemiosis neumónica fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1915 y en el Reino Unido en 1925. En México también se tiene reportes desde principios del siglo XX. La morbilidad que ocasiona ésta enfermedad en el ganado, es un problema desafiante y persistente. Aunque se presenta en cualquier época del año, la incidencia aumenta durante el inicio del verano o del invierno cuando hay cambios bruscos de temperatura. En 1921 se aisló el germen de rumiantes, y en 1932 se propuso el nombre de *Pasteurella haemolytica* (González, 2007).

El género *Pasteurella* está conformado por un amplio grupo de especies de bacterias que se entrecruzan en sus características fenotípicas y genotípicas, por lo que desde hace varios años se han realizado investigaciones con el propósito de clasificarlas adecuadamente (Jaramillo *et al.*, 2009).

I.2. Reclasificación de *M. haemolytica*.

M. haemolytica originalmente fue llamada *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt, en 1885; posteriormente, en 1896 Flugge la renombra *Bacillus bovisepitica* y en 1932 Newson y Cross proponen el nombre de *Pasteurella haemolytica*. Entre 1959 y 1961, Smith describe 2 biotipos de *P. haemolytica* sobre la base de características fenotípicas y de diferencias epidemiológicas y patológicas, clasificándolos como A y T, según su habilidad para fermentar la L-arabinosa o la trealosa, respectivamente (Zecchinon *et al.*, 2005).

En 1960, Biberstein explico la relación entre serotipos y biotipos de *P. haemolytica*, en base a esos estudios de serotipificación que fueron por medio de hemoaglutinación indirecta (HAI) de antígenos capsulares solubles, pero fue hasta 1962 que Biberstein y Gills reconocieron 11 serotipos capsulares por el mismo método (Tefera *et al.*, 2001).

A principios de 1980, Mannheim *et al.*, realizaron estudios genéticos de miembros representativos del género *Histophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella* (grupo HAP) concluyendo que el grupo HAP, debería ser categorizado como familia, lo que trajo como consecuencia renombrar algunas especies que fueron erróneamente clasificadas dentro de este. Hacia 1981, Mannheim propuso una nueva familia, denominándola *Pasteurellaceae* que consideraba que los tres géneros del grupo HAP, debían conservar distinta identidad. En el mismo año, Pohl sugirió que *Pasteurella haemolytica* biotipo A, estaba mucho más asociada genéticamente a *Actinobacillus lignieresii* (Tefera *et al.*, 2001).

Mediante estudios de ribotipificación, electroforesis de enzimas multi-locus de secuenciación del gen 16S del ARNr e hibridación ADN-ADN, los serotipos de *P. haemolytica* A, fueron reclasificados en un nuevo género, denominado *Mannheimia*. Dichos cambios se pueden observar en el Cuadro 1. En consecuencia, los anteriores serotipos A de *P. haemolytica* (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) fueron renombrados como *Mannheimia haemolytica*. El serotipo 11, que no está relacionado con *M. haemolytica*, se denominó como *M. glucosida*. Según la clasificación propuesta por Angen *et al.* (1999); el género *Mannheimia* comprende cinco especies: *M. haemolytica* (originalmente biogrupo 1) que incluye los serotipos A (1, 2, 5-9, 12-14, 16 y 17), todos aislados de rumiantes. *M. granulomatis*, que incluye a cepas previamente clasificadas como *P. granulomatis*, Bisgaard taxón 20 y *P. haemolytica* biogrupo 3J, incluye también todas las cepas clasificadas genéticamente como *P. haemolytica-like*, aisladas de conejos, liebres y bovinos, asociadas a neumonías y conjuntivitis purulenta en lepóridos y granulomas en piel y otras enfermedades en bovinos. *M. glucosida* incluye cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos 3 A-H y 9, así como al serotipo 11 y todas sus cepas, la mayoría aisladas de cavidad nasal de borregos, en algunos casos con neumonías u otras enfermedades. *M. ruminalis*, que incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii* y *P. haemolytica* biogrupo 3J, aisladas del rumen de bovinos y ovinos, no asociadas con estados patológicos. Por último, *M. varigena*, que comprende un grupo de cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupo 6 y Bisgaard taxón 15 y 36, han sido aisladas de bovinos y porcinos, y asociadas con sepsis, neumonía y otros estados patológicos (Angen *et al.*, 1999).

M. haemolytica es comensal del tracto respiratorio del ganado bovino, ovino y otros rumiantes. Siendo la principal etiología bacteriana asociada al desarrollo del proceso neumónico. La enfermedad se conocía como Fiebre de Embarque y en ovinos se denominaba pasterelosis ovina. Ambos procesos contenidos en el complejo neumónico respiratorio de cada especie. Sin embargo, y debido a la reclasificación del agente etiológico, actualmente a la enfermedad se le denomina mannheimiosis neumónica en rumiantes en general. Por lo que en el desarrollo del presente escrito, se continuará con esa denominación (Juárez *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Cambios generales en la nomenclatura de *Mannheimia haemolytica*.

Designación anterior	Designación actual
Serotipos <i>Pasteurella haemolytica</i>: A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16	<i>Mannheimia haemolytica</i> Serotipos sin cambios
Serotipo <i>P. haemolytica</i> A11	<i>M. glucosida</i> A11
<i>P. haemolytica</i> sin tipificar	Principalmente <i>Mannheimia ruminalis</i> sp.
Serotipos <i>P. trehalosi</i>: T3, T4, T10, T15	Sin cambios

I.3. Importancia económica de la Mannheimiosis Neumónica.

La enfermedad, es la responsable de considerables pérdidas económicas en el ganado ovino. La industria de la carne en los bovinos, reporta pérdidas económicas debido a enfermedades que cursan con neumonías. Los costos asociadas a pérdidas se estiman en más de mil millones de dólares al año sólo en Norteamérica. Estas pérdidas incluyen la muerte de los animales, disminución en las ganancias de peso, pobre conversión alimenticia, así como elevados costos en el tratamiento de animales afectados (González, 2008).

La mannheimiosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el ganado de Estados Unidos y Canadá, con brotes que llegan a afectar entre 80% y 90% de los animales, con tasas de letalidad menores al 5%. Se calcula que aproximadamente 25% de los animales en producción experimentan al menos un episodio de enfermedad respiratoria durante el primer año de vida, con tasas que van de los 14% a 38%. Las incidencias son mayores en los machos que en las hembras, tanto en la etapa previa al destete como en los periodos de engorda. Se estima que las neumonías causan aproximadamente, el 75% de los casos clínicos y provocan de 45% al 55% de la mortalidad; su tratamiento llega a representar el 8% del total de los costos de producción (Jaramillo *et al.*, 2009).

En el caso de los ovinos, los procesos respiratorios son la principal causa de mortalidad en corderos de más de 20 días de vida y representan más de la mitad de las bajas que se producen desde ese momento hasta la venta de los mismos. Esta distribución hace del complejo respiratorio, un proceso costoso comparado con otras causas de muerte (mal calostrados, procesos diarreicos, etcétera), ya que cuando el cordero muere, el gasto que el ganadero ha soportado en alimentos tanto para la madre como para él, es mayor (González, 2008).

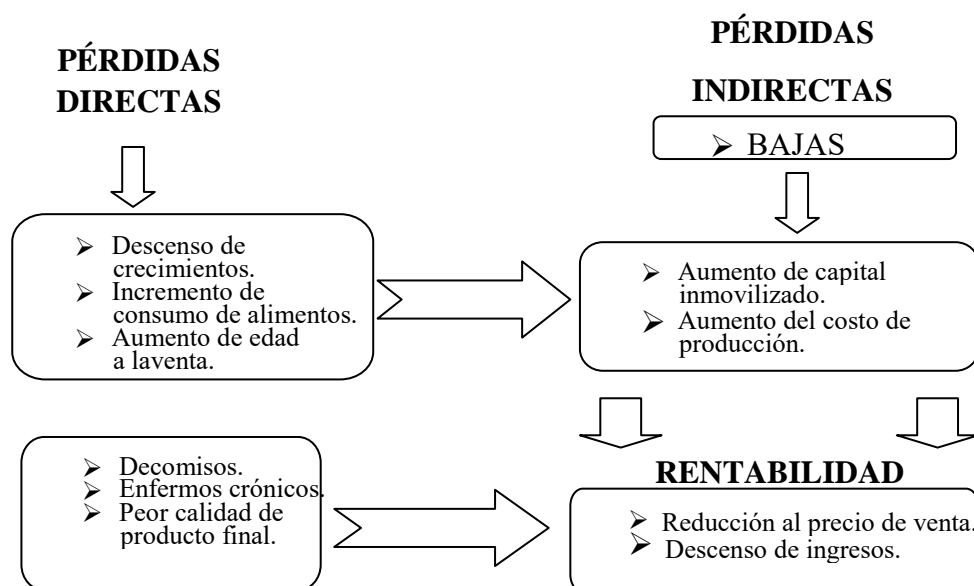


Figura 1. Pérdidas en la producción ovina causadas principalmente por enfermedades respiratorias.

I.4. Características de *M. haemolytica*.

M. haemolytica es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no móvil, de forma cocobacilar o de bacilo pequeño pleomórfico (1 a 3 μm de diámetro), mesofílica, aerobia y anaerobia facultativa, oxidasa positiva e indol negativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas. Pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, del género *Mannheimia*. Esta es patógena para ganado bovino, ovino y cabras. Entre los principales antígenos producidos por *M. haemolytica*, están la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PRH), adhesinas, leucotoxina (LKT), hialuronidasa y neuraminidasa. Es negativa a las pruebas de rojo de metilo, gelatinasa y Voges– Proskauer. Crece en agar MacConkey, en medios enriquecidos como agar chocolate o agar sangre, formando colonias lisas de color blanco grisáceo, con tamaños de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 horas de incubación. La mayoría de las cepas producen una β -hemólisis cuando crecen en agar con sangre de bovino. Es capaz de fermentar D- sorbitol, D-xilosa, maltosa y dextrina y son negativas a la ornitina descarboxilasa y NPG (β -glucosidasa), pero positivas a ONPF (α -fucosidasa). La presencia de cápsula con propiedades de superficie antifagocíticas la hacen parcialmente resistente a fagocitosis (Angen *et al.*, 1999; Boyce *et al.*, 2004).

De los 12 serotipos reconocidos para *M. haemolytica*, el A1 y A2 son los más comunes en bovinos y ovinos respectivamente a nivel mundial. Estudios recientes en Alemania y Estados Unidos de América, mencionan que además del A1, el A6 ha sido registrado como el más frecuentemente aislado en pulmones neumónicos de bovinos (Al-Ghamdi *et al.*, 2000; Ewers *et al.*, 2004). También se han registrado los serotipos A11 (*M. glucosida*) y A12 (Zecchinon *et al.*, 2005; Jaramillo *et al.*, 2007; Jaramillo *et al.*, 2008). En los bovinos, por lo general se aísla principalmente el serotipo A1, mientras que el serotipo A2 se asocia a la Mannheimiosis neumónica en ovinos (Colín *et al.*, 1987; Burrows *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1995). Los ovinos jóvenes son más susceptibles al serotipo A2, que los adultos (González *et al.*, 2007). Sin embargo, los serotipos A5, A6, A7, A8, A9 y A12, también pueden estar relacionados con el desarrollo de neumonías en esta especie (Jaramillo *et al.*, 2009).

Estos dos serotipos (A1 y A2) son capaces de colonizar el tracto respiratorio superior de bovinos y ovinos y con frecuencia son especie-específicos en su capacidad de afectar el tracto respiratorio inferior y producir la enfermedad (Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005).

M. haemolytica con mucha frecuencia se asocia a *P. multocida* en el desarrollo de las enfermedades respiratorias, hay variaciones entre las diferentes cepas en cuanto a su capacidad para producir enfermedad en sus hospedadores (Highlander, 2001; Jaworski *et al.*, 1998). *P. multocida* se ha identificado como un importante patógeno de los animales durante muchos años. Sin embargo, actualmente la frecuencia y la significancia de *M. haemolytica* como principal patógeno potencial ha sido reconocida ampliamente en los últimos años, así lo demuestran numerosas investigaciones sobre enfermedades virales donde *P. multocida* y *M. haemolytica*, se asocian como invasores secundarios, que desencadenan la enfermedad primaria (Carter, 1967).

En los bovinos sanos es común que el serotipo A2 esté presente en el tracto respiratorio superior, pero después de un estado de estrés o de una infección viral, el serotipo A1 rápidamente reemplaza al A2 como el serotipo principal. Esto probablemente se deba a una transmisión horizontal a partir de animales enfermos que tengan el A1 activo en secreciones nasales (Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005). Se ha podido comprobar que el serotipo A2, predominó en exudado de becerros en granja y cuando estos animales fueron trasladados a corrales de subasta y luego a corrales de engorda se encontró que predominó el A1 (Biberstein, 1978; Colín *et al.*, 1987). Diversos estudios serológicos sugieren que es posible que ocurra la transmisión interespecie de *M. haemolytica* desde animales domésticos hacia animales silvestres, o viceversa (Villard *et al.*, 2006).

En un trabajo que se realizó en los Estados Unidos, en los cuales se tomaron muestras directamente de la cavidad nasal de ovinos, el serotipo A2 fue el que se aisló con más frecuencia, aunque los serotipos A1, A7, A8 y A9, se aislaron también con relativa frecuencia. Así como también en un estudio realizado en Gran Bretaña con cepas de *M. haemolytica* aisladas de pulmones neumónicos de ovinos, indicó que el serotipo A2 es el más frecuentemente aislado en estos procesos. En México, un estudio realizado en 2009 por Jaramillo *et al.*, en los cuales se obtuvieron muestras de pulmones

neumónicos y de cavidad nasal de bovinos y ovinos, con lo cual se revelo que los serotipos más frecuentes para los bovinos es el A1 y A2, mientras que para los ovinos lo son el A1, A2, A5 y A9 (Jaramillo *et al.*, 2009).

I.5. Factores de virulencia de *M. haemolytica*.

A las cepas de *M. haemolytica* que afectan a los rumiantes se les han identificado diversos mecanismos de expresión de su patogenicidad a través de potentes antígenos, los cuales incluyen: una leucotoxina (LKT) con actividad específica contra leucocitos; lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (PME), microvesículas de membrana externa (MVs), proteínas reguladas por hierro (PRH), fimbrias, enzimas (neuraminidasa, proteasas, metaloglicoproteasas), antígenos aglutinantes serotipoespecífico y adhesinas; además de la cápsula y plásmidos de resistencia a antibióticos (Burrows *et al.*, 1993; Fedorova *et al.*, 1997; Lo, 2001; Marciel *et al.*, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2002). Todos estos mecanismos juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad, sin embargo, sólo la leucotoxina es considerada como el factor de patogenicidad primario más importante (Fedorova *et al.*, 1997; Marciel *et al.*, 2001; Narayanan *et al.*, 2002; Highlander *et al.*, 2000). Todos los genes relacionados con los factores de virulencia identificados han sido localizados en el genoma de *M. haemolytica* A1, el cual ha sido secuenciado recientemente (Gioia *et al.*, 2006).

I.5.1 Proteínas de membrana externa (PME)

Las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram negativas tienen un importante papel en el proceso de infección. Algunas de éstas, tienen función de porinas que permiten el transporte de sustancias a través de la membrana externa, mientras que la fosfolipasa A, es una PME de las bacterias Gram negativas, esencial en ciertos patógenos para la invasión a las células del hospedador. Otras PME pueden actuar como receptores de alta afinidad para obtener hierro del medio (Squire *et al.*, 1984). Se sabe además que las proteínas de membrana externa aisladas de *M. haemolytica* inducen alteraciones en la actividad biológica de los leucocitos polimorfonucleares. A dosis dependientes, se ha observado que reducen la capacidad de

adherencia a la pared de nylon y actúan como quimiotactinas a concentraciones de entre 5 y 20 $\mu\text{g/ml}$ (Iovane *et al.*, 1998).

Una bacteria en diferentes condiciones, expresa diferentes fenotipos para adaptarse a un nuevo medio. En ausencia de hierro, la bacteria expresa en su superficie proteínas especialmente dedicadas a captarlos. Estas proteínas han recibido mucho interés por parte de diversos grupos de investigación. Sin embargo, de momento no se conoce mucho de éstas y de sus mecanismos de patogenicidad, aunque inmunológicamente tienen importante significado en la inmunidad protectora contra la manhemiosis neumónica causada por el serotipo A2 principalmente. Se ha realizado la vacunación experimental en corderos, a partir de extractos con salicilato de sodio de *M. haemolytica* serotipo A2, cultivadas bajo condiciones de restricción de hierro, obteniéndose un 100% de protección; en contraste, con la protección obtenida con organismos que crecieron bajo condiciones de suficiente hierro, que fue solo de cerca del 50% (Donachie, 1997).

Estas proteínas reguladas por hierro, se encuentran involucradas en adquirir hierro del ambiente, el cual es un elemento esencial para la supervivencia de todas las células, pero la disponibilidad de hierro en el tejido de un animal infectado está restringida por proteínas captadoras de hierro, propias del hospedador. Las proteínas reguladas por hierro de las bacterias trabajan específicamente compitiendo con estas proteínas del hospedador, para quitarles el hierro. Sin proteínas reguladas por hierro, la célula bacteriana no podría adquirir suficiente hierro para multiplicarse y crecer, siendo así más susceptible de ser eliminada por el hospedador (Donachie, 1997).

La mayoría de las bacterias Gram negativas tienen aproximadamente 20 PME, pero en algunas de éstas, se encuentran presentes de 4 a 6 PME principales, que constituyen una gran parte del contenido proteico de la membrana externa (Kyd *et al.*, 1994). Se sabe que hay estimulación del sistema inmune por las PME, porque la bacteria se adhiere a las células del hospedador para evitar ser más fácilmente fagocitada, dañando de esta forma la función de la membrana celular (Beveridge, 1999). Las PME de las bacterias Gram negativas, podrían ser elementos importantes para la elaboración de vacunas, ya que se desarrollan y estimulan una respuesta inmune protectora y de

resistencia a la *mannheimiosis* neumónica, al exponerse en la superficie de la bacteria, siendo así potenciales blancos para el sistema inmunológico del hospedador, desencadenando respuestas de fijación de complemento y de opsonización por anticuerpos (Pandher *et al.*, 1996).

I.5.2. Lipopolisacárido (LPS).

Otro de los factores de virulencia de *M. haemolytica* es el lipopolisacárido (LPS), el cual ha sido mejor estudiado en el serotipo A1 y comprende del 10 al 25% del peso seco de la bacteria. Presenta el lípido A, en una región central compuesta de Hex-Hep-ac2ceto-3- deoxioctulosónico y un polisacárido somático o unidades trisacáridas repetitivas de dos residuos de D-galactosa y un residuo de N-acetil-D galactosamina (Severn *et al.*, 1992).

El LPS se encuentra generalmente integrado a la pared celular bacteriana, pero en animales infectados ha podido detectarse en forma libre en las lesiones pulmonares (Breider *et al.*, 1990). Al LPS se le considera uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria. Las lesiones que induce, constan de grandes áreas de hiperemia y edema que abarcan zonas de deposición de células inflamatorias invadiendo en ocasiones lóbulos adyacentes, además pueden observarse también focos de hemorragia y adherencia fibrinosas (Brogden *et al.*, 1995). Usando técnicas de inmunohistoquímica, se ha logrado mostrar que la endotoxina es liberada dentro del exudado inflamatorio y se localiza en los neutrófilos, alvéolos, en el intersticio y en el lumen capilar, dentro de macrófagos alveolares, en las células endoteliales y en la superficie de células epiteliales (Laurance *et al.*, 1992).

Microscópicamente se observa, que el LPS, induce el influjo de neutrófilos, exudación de fibrina, edema en los espacios alveolares, agregación de plaquetas y neutrófilos en los capilares; estos eventos son consecuencia del daño al endotelio vascular inducido por el macrófago activado y la liberación de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina-1, leucotrienos y ácido araquidónico (Breider *et al.*, 1990; Fenwick, 1990; Paulsen *et al.*, 1990; Breider *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1992; Yoo *et al.*, 1995).

Los mecanismos de acción de la endotoxina a nivel celular y en general en el resto del organismo han sido extensamente estudiados y resultan muy complejos. El lípido del LPS tiene la capacidad de activar proteasas séricas y éstas a su vez activar el factor Hageman y el primer componente de la vía clásica del complemento. El componente polisacárido del LPS puede activar la vía alterna del complemento. La activación del factor Hageman permite la activación de la cascada de la coagulación, el sistema de las cininas y del plasminógeno. Este sistema es capaz de producir numerosos factores proinflamatorios, activando componentes celulares de la inflamación (Laurance *et. al.*, 1992).

La participación del LPS podría ser el resultado de las funciones moduladas por los leucocitos bovinos y la simulación de la respuesta inflamatoria del hospedador, de este modo se exagera el daño a sus tejidos; de igual manera, el LPS participa como mediador en el incremento de las citocinas proinflamatorias, lípidos mediadores, procoagulantes, radicales de oxígeno y proteasas, generados por los monocitos y los macrófagos bovinos (Zecchinon *et. al.*, 2005; Boyce *e.t al.*, 2004). Se ha podido demostrar que el LPS incrementa la actividad citolítica de la LKT y que aumenta la expresión de LKT-dependiente de la IL8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Es probable que *in vivo*, el LPS y la LKT actúen de manera sinérgica causando daño a los tejidos e inflamación (Lafleur *et. al.*, 1998; Highlander, 2001; Lafleur *et. al.*, 2001).

I.5.3. Leucotoxina (LKT).

La LKT es una exotoxina que producen su efecto tóxico primario sobre los leucocitos, en particular los leucocitos de rumiantes y especialmente sobre macrófagos alveolares y células polimorfonucleares (PMN). La toxina origina una amplia variedad de efectos biológicos sobre los leucocitos bovinos, que al asociarse a los otros factores de virulencia, culminan finalmente en el desarrollo de una pleurobronconeumonía fibrinosa aguda (Leite *et. al.*, 2002; Narayanan *et. al.*, 2002; Deshpande *et. al.*, 2002; Sleim, 2005).

La LKT es una proteína de 104 kDa, sintetizada y excretada por *M. haemolytica* durante su fase de crecimiento logarítmico (Shewen *et. al.*, 1985; Chang *et. al.*, 1987).

Esta LKT es un miembro de la familia de las toxinas RTX (Welch, 1991). La actividad citolítica de las toxinas RTX, es dependiente del calcio (Lea-Master *et al.*, 1987; Gerbic *et al.*, 1989; Boehm *et al.*, 1990). Las toxinas RTX, lisan células blanco mediante la formación transmembranal de poros (Bhakdi *et al.*, 1986; Clinkenbeard *et al.*, 1989; Menestina *et al.*, 1987). Muchas toxinas RTX, incluyendo la LKT de *M. haemolytica*, son también potentes estimuladores de leucocitos cuando están presentes en bajas concentraciones, induciendo la expresión de citocinas proinflamatorias, que favorecen la severidad de las lesiones, tal es el caso del leucotrieno B4 (LTB4), el cual es un importante agente quimiotáctico para leucocitos polimorfonucleares en el desarrollo de la neumonía fibrinopurulenta aguda del ganado (Bhadki *et al.*, 1991; Maheswaran *et al.*, 1992).

Esta LKT produce daño específico en leucocitos de rumiantes, exhibiendo solo una leve actividad hemolítica contra eritrocitos en esta especie. La LKT parece jugar un papel importante en la patogénesis de la infección por *M. haemolytica*. Se presume que esta función, es destruir leucocitos, principalmente macrófagos alveolares en el sitio de infección, lo cual reduce la capacidad del hospedador de establecer una respuesta inmune eficiente, induciendo eventos de inflamación, que desencadenan un severo daño al pulmón. En adición a esto, las enzimas liberadas por leucocitos dañados en el tejido pulmonar, contribuyen a la severa necrosis observada en las infecciones por *M. haemolytica*. La LKT por sí misma, no es tóxica para el epitelio bronquial; la severidad de las lesiones en los septos alveolares, depende en su mayor parte de la acumulación de leucocitos polimorfonucleares (Kaehler *et al.*, 1980; Balayut *et al.*, 1981; Himmel *et al.*, 1982; Shewen *et al.*, 1982; Sutherland, 1985; Ortíz *et al.*, 1992).

Estudios previos han mostrado, que la estimulación a los neutrófilos de bovinos por la LKT, resulta en una elevación de calcio intracelular por influjo de éste desde el medio, a través de canales de entrada con carga (Emert *et al.*, 1992). Hallazgos similares se han descrito en neutrófilos de humano por LKT de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Welch, 1991). El influjo de calcio dentro de las células induce la activación de fosfolipasa, liberación de factor activador de plaquetas y ácido araquidónico con la subsecuente formación de lípidos vasoactivos y quimiotácticos; también activación del estallido respiratorio y degranulación e inducción de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-

α). En adición a otros mediadores inflamatorios, se incluyen productos liberados por los leucocitos, que pueden inducir la migración de más leucocitos al sitio de lesión. Estos son productos de la 5lipoxigenasa del ácido araquidónico e incluyen al leucotrieno B4 y al ácido 5hidroxieicosatetraenóico, que son potentes agentes quimiotácticos. Se sabe que estos agentes inducen el reclutamiento de células, además de exacerbar los eventos inflamatorios en las lesiones microvasculares (Wang *et al.*, 1998).

Los mecanismos inducidos por la LKT, mediante los cuales se activan los leucocitos, no han sido totalmente determinados, pero es requerido un incremento en el calcio intracelular. Se han realizado estudios asociados al fenómeno de apoptosis celular en relación a algunas bacterias patógenas que intentan utilizar este mecanismo como un arma más sobre las respuestas del hospedador. Recientemente, se han descrito que ciertas toxinas RTX pueden inducir un proceso de apoptosis en las células blanco. La habilidad de estas toxinas bacterianas, de inducir a bajas concentraciones la muerte celular de leucocitos, puede jugar un papel significativo en la iniciación y persistencia de la infección, dándole al patógeno diversas ventajas en la batalla contra los mecanismos de respuesta al hospedador (Stevens *et al.*, 1996).

I.5.4. Microvesículas (MVs) de membrana externa.

La pared celular de las bacterias Gram negativas en general, contiene una capa fina de peptidoglicano adyacente a la membrana citoplásmica, que es responsable de la incapacidad de la pared celular para conservar el color violeta en la decoloración con etanol durante la tinción de Gram. El peptidoglicano es responsable de la rigidez de la pared celular bacteriana y determina la forma de la célula. La pared es relativamente porosa y no constituye una barrera para los substratos pequeños. Además de la capa de peptidoglicano, la pared celular de las bacterias Gram negativas, también contiene una membrana externa adicional compuesta por fosfolípidos y lipopolisacáridos que hacen frente a las condiciones exteriores. La naturaleza altamente cargada de los LPS's confiere una carga negativa total a la pared. La estructura química de los LPS's externos de la membrana es a menudo única a las cepas bacterianas específicas y es responsable de muchas de las características antigénicas de estas cepas (Beveridge, 1999).

La parte lipídica de la membrana externa es en gran parte impermeable a todas las moléculas cargadas. Sin embargo, unos canales de porinas, están presentes en la membrana externa, permitiendo el transporte pasivo de muchos iones, azúcares y aminoácidos a través de la membrana externa. Estas moléculas están, por lo tanto, presentes en el periplasma, la región comprendida entre las membranas citoplasmática y exterior. El periplasma contiene la capa de peptidoglicano y muchas proteínas responsables de la unión al substrato, hidrólisis y recepción de señales extracelulares. Se supone que el periplasma se encuentra en un estado de tipo gel más que en estado líquido debido a la alta concentración de proteínas y de peptidoglicano que contiene. Debido a la localización del periplasma entre las membranas citoplásmica y externa, las señales recibidas y los substratos son transportados mediante las proteínas que contiene (Beveridge, 1999).

La pared celular de estas bacterias, es lo suficientemente fuerte como para resistir y soportar condiciones extremas de temperatura y pH (por ejemplo, *Thiobacillus ferrooxidans* crece a un pH de 1 a 0.5) y llega a ser elástica como para expandir varias veces su superficie normal. La pared celular de estas bacterias es una estructura notable que protege el contenido de la célula y que ha superado la prueba del tiempo a través de los años (Higgins *et. al.*, 1976; Beveridge *et. al.*, 1991; Koch *et. al.*, 1992; Koch, 1998; Giesbrecht *et. al.*, 1998; Beveridge, 1999).

Las paredes celulares de las bacterias Gram negativas tienen una característica dinámica que es producir vesículas de membrana externa, las cuales se encuentran en constante descarga de la superficie celular, lo cual ocurre durante el crecimiento bacteriano. Estas vesículas poseen proteínas de membrana externa, LPS, fosfolípidos, y componente periplasmático, pero en una escala mucho menor de acuerdo a la cantidad que normalmente se presenta dentro de una bacteria (Beveridge, 1999).

Se tienen informes de estas vesículas desde hace 30 años a la fecha. Su importancia general ha sido reconocida recientemente, y se les denomina vesículas de membrana o microvesículas. Se ha encontrado que estas estructuras emanan en mayor cantidad en el modo de *biofilms*, en medios sólidos o líquidos y en ambientes naturales. Las microvesículas de *P. aeruginosa* han sido hasta el momento de las más estudiadas (Beveridge, 1999).

El reconocimiento del método mediante el cual las MVs son liberadas a partir de la superficie de una bacteria Gram negativa, ha asegurado un rearrreglo natural externo de la misma, donde generalmente se mantiene estructural el LPS, fosfolípidos y proteínas de membrana externa como componentes integrales de las MVs (Beveridge, 1999; Ratchapin *et. al.*, 2002).

Las MVs son normalmente secretadas, como producto de una bacteria Gram negativa. Cuando la vesícula se forma, una parte de la membrana externa se pliega arrastrando consigo contenido periplásmico, dichas estructuras se forman en todas las etapas de crecimiento bacteriano así como en tejidos infectados (Beveridge, 1999).

Las microvesículas purificadas, han mostrado tener la capacidad de actuar como un sistema de acarreo de factores de virulencia al interactuar tanto con células procariontas como eucariotas. Además, éstas pueden afectar el curso de la infección y recibir respuesta de la misma. Las MVs no son un producto de muerte celular ya que contienen proteínas recién sintetizadas que son producidas sin el fenómeno concomitante de la lisis bacteriana, como se muestra en la **Figura 2** (Beveridge, 1999).

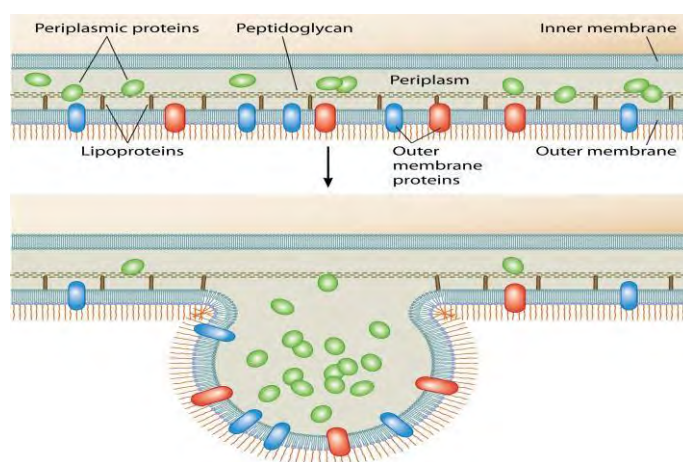


Figura.2. Modelo de producción de MVs bacterianas. Se muestra la formación de una vesícula de una bacteria Gram negativa, la cual incluye membrana externa, así como material periplásmico, proteínas de membrana externa y lípidos, incluyendo PAMPs y otros factores de virulencia (Terri *et. al.*, 2010).

La producción de vesículas fue demostrada al ser vinculada a la respuesta de estrés bacteriano. Los niveles de vesiculación aumentan durante estos períodos, esto

podría estar experimentando la bacteria, durante la colonización de ésta en los tejidos del hospedador (Terri *et. al.*, 2010).

Las vesículas son partículas de forma esférica principalmente, cerradas de un tamaño heterogéneo (10 a 300 nm en diámetro) liberadas durante todas las fases de crecimiento bacteriano (Terri *et. al.*, 2010). La microscopía electrónica (ME) revela estudios sobre la formación de las vesículas, donde se aprecia la formación de plegamientos de membrana externa y fusión subsecuente de la misma (Beveridge, 1999).

M. haemolytica libera múltiples proteínas de interés inmunogénico, contenidas en estas MVs y lo hace en mayor cantidad, cuando los cultivos se someten a estrés. A partir de dichas estructuras se han caracterizado los principales antígenos liberados por la bacteria durante la patogénesis de la misma. Entre los que se determinó a la LKT, LPS, PME de interés inmunogénico (45, 54 y 60 kDa) principalmente y un fragmento de ADN de 23 kpb (González *et. al.*, 2007). Por otro lado, Ávalos *et. al.*, (2011) evaluaron los cambios estructurales mediante microscopía electrónica de células epiteliales de pulmón, macrófagos alveolares y linfocitos tisulares (nódulo linfoide tranqueobronquial) de ovino, en condiciones *in vitro*, al interactuar con diferentes concentraciones de MVs completas de *M. haemolytica* A2. En dicho trabajo, se evidenció que el tipo celular más resistente a la presencia de 1200 µg de MVs en condiciones de cultivo celular fueron los linfocitos y los macrófagos alveolares, quienes desarrollaron características morfológicas que sugieren activación celular. Por otro lado, Riquelme *et. al.* (2011) demostraron que las MVs de *M. haemolytica* A2, acarrean LKT biológicamente activa, lo cual se demostró evaluando la toxina (300 µg de LKT) a partir de MVs en presencia de mononucleares sanguíneos de ovino en condiciones de cultivo celular, lo cual indujo en dichas células el desarrollo de apoptosis al ser evaluadas por microscopía confocal.

Por otro lado, González *et. al.* (2007) demostraron en condiciones experimentales, que corderos de tres meses de edad inmunizados con MVs de *M. haemolytica* A2 por vía intranasal y posteriormente desafiados experimentalmente con una cepa de campo patógena de *M. haemolytica* A2, desarrollaron elevada respuesta de IgA a nivel de mucosa nasal que protegió del desafío y evitó el desarrollo de lesiones

neumónicas características de la enfermedad en el 100% de los animales vacunados por esta vía.

La composición de las MVs de membrana externa las hacen potentes activadores de los patrones de respuesta de la inmunidad innata y adquirida en el hospedador. En adición a esto, dichas estructuras acarrean potentes moléculas inmunoestimuladoras como lo es el LPS y porinas entre otras, así como ligandos activadores de la inmunidad innata. Juntos, todos estos componentes parecen actuar sinérgicamente para modular la respuesta del hospedador en el sentido de estimular el espacio vital del patógeno que induzca su virulencia o que potencialice la infección o ambas. Además, las MVs tienen propiedades inmunogénicas que permiten una respuesta protectora de anticuerpos sistémicos o de mucosa cuando han sido explotadas para propósitos vacunales (Terri *et. al.*, 2010).

Las MVs son factores claves en la respuesta de los patógenos al inducir un proceso inflamatorio. Las MVs producidas durante la colonización bacteriana, pueden ser captadas por las células epiteliales y macrófagos circundantes, para desencadenar una respuesta inmediata del hospedador. La respuesta de estas células a la presencia de los productos de secreción bacteriana inicia la cascada de la inflamación. Alaniz *et. al.* (2007) demostraron que las MVs de *Salmonella enterica* serovariedad *typhimurium* son potentes estimuladores proinflamatorios de secreción de citocinas y activadores de la inmunidad celular. Las MVs de *Salmonella* activan macrófagos y células dendríticas al incrementar la expresión de los niveles en su superficie del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), así como de la producción de mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12). Las MVs también activan el CD4 celular, indicando que los componentes antigénicos proteicos de las MVs han sido efectivamente procesados y presentados a las respectivas células presentadoras de antígenos (Terri *et. al.*, 2010).

Actualmente, se han desarrollado una nueva generación de biológicos a partir de MVs, como vacuna acelular enriquecidas con dichas estructuras, las MVs liberadas por la bacteria conserva su identidad superficial de la bacteria donante (Terri *et. al.*, 2010).

La producción de MVs en todas las bacterias Gram negativa, generalmente se puede observar mediante microscopía electrónica (**Figura 3**) en donde se aprecian múltiples estructuras vesiculares de diferentes formas y tamaños que en algunos casos llegan a unirse formando estructuras de mayor tamaño (Beveridge, 1999).

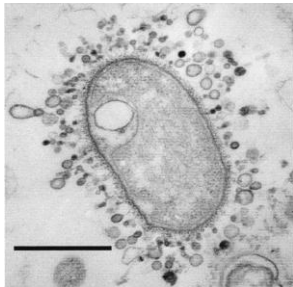


Figura 3. Bacteria Gram negativa no identificada. Esta bacteria posee una microcápsula y libera una gran cantidad de MVs (Beveridge, 1999).

I.7. Microbiota del aparato respiratorio

Como cualquier otra membrana mucosa que está en contacto directo con el ambiente, el aparato respiratorio tiene su propia microbiota. Si se introduce un hisopo en condiciones asépticas hasta las partes profundas de la cavidad nasal y se siembra en medios de cultivo apropiados, crecerán abundantemente diferentes géneros y especies de bacterias. Esta población mixta de microorganismos constituye la flora nasal bacteriana del aparato respiratorio. La microbiota respiratoria está restringida únicamente a la porción proximal del sistema de conducción (cavidad nasal, nasofaringe y laringe) mientras que las porciones distales del sistema de conducción (tráquea y bronquios), el sistema de transición (bronquiolos) y el sistema de intercambio (alvéolos) son membranas esencialmente estériles (López, 2004).

Los tipos de bacterias (aerobias y anaerobias) presentes en la microbiota nasal varían considerablemente en las especies animales, así como también, varían de acuerdo al medio ambiente en el que se crían los animales. Es importante destacar que ciertas bacterias de la microbiota normal son capaces de producir severas infecciones respiratorias. Por ejemplo, *M. haemolytica* es un habitante normal de las criptas de las tonsilas de los rumiantes, pero también es el agente infeccioso causante del complejo respiratorio (López, 2004).

Estudios experimentales en animales domésticos y de laboratorio han demostrado que las bacterias de la microbiota nasal son acarreadas constantemente a los

pulmones en el aire inspirado. Los pulmones permanecen estériles gracias a sus eficientes mecanismos de defensa a pesar de este constante acarreo de bacterias en el aire inspirado (López, 2004).

Las cepas de *M. haemolytica* no tipificables, también se aíslan con frecuencia variable, como por ejemplo, un 66.7% en tracto intestinal y un 16.6% en cerebro. En exudado nasal de ovinos se ha registrado 9.3% en México, 15.8% en Estados Unidos de América, 25% en Dinamarca; y en pulmones neumónicos, 3.6% en Etiopía, 7% en Hungría y 8.3% en Turquía. En estudios realizados en México se encontraron frecuencias de aislamientos de *M. haemolytica* superiores a las registradas hasta ahora en otros países. En exudado nasal se encontraron frecuencias de 69% en animales sanos y 67% en animales enfermos. En Gran Bretaña se ha registrado 9.3% en exudado nasal y 12.8% en pulmones neumónicos de becerros, y en vacas, 20.1% en exudado nasal, 16.2% en pulmones neumónicos, 29.4% en sangre, 25% en hígado y bazo, 72.2% en tracto genital, 89.5% en ubre de animales enfermos y en pulmones neumónicos de bovinos el 71% (Jaramillo *et. al.*, 2009).

I.7. Factores predisponentes para la presentación de la mannheimiosis neumónica.

La mannheimiosis neumónica, es un proceso multietiológico donde se ven involucrados diversos factores de riesgo que determinan la presentación y severidad de las lesiones neumónicas, entre ellos destacan los relacionados con el manejo de los animales que generan estrés, cambios bruscos de temperatura, hacinamiento, transporte, confinamiento de animales de diferentes edades, condiciones del destete, nivel de inmunoglobulinas en el calostro, entre otros; así mismo, intervienen otros agentes infecciosos de origen bacteriano y particularmente agentes primarios de tipo viral, tales como el virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), el virus de parainfluenza 3 (PI3), el de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y ocasionalmente, adenovirus tipo 2. Estos virus causan efecto citopático directo en el aparato respiratorio; además, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar, lo cual favorece la colonización pulmonar por bacterias de la familia *Pasteurellaceae* (Jaramillo *et. al.*, 2009).

La mayor dificultad en el control de este proceso, es la existencia de muchos factores interrelacionados que provocan un aumento del riesgo de presentación de los problemas. Estos factores pueden dividirse en: propios del animal, factores estresantes y factores ambientales (González, 2008), así como se muestra en la **Figura 4**.

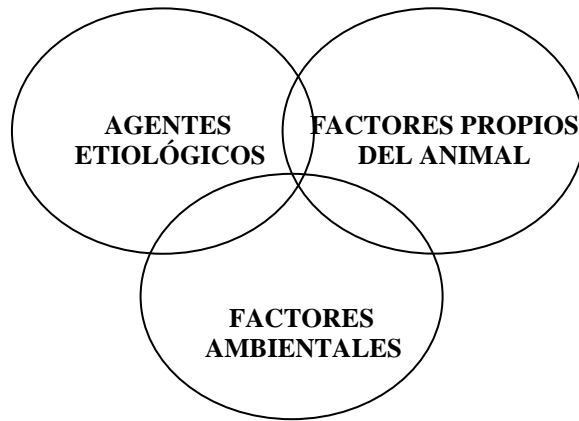


Figura 4. Interrelación de los factores etiológicos, ambientales y propios del animal, que detonan la presentación de la enfermedad (González, 2008).

Entre los factores propios del animal que favorecen la incidencia destacan: la genética del animal, modificaciones fisiológicas de la frecuencia respiratoria y el plano de alimentación. Con respecto a la raza de los animales, existe más resistencia de las razas autóctonas por su mayor adaptación al medio (González, 2008).

Los factores estresantes como transporte, cambios de alimentación, manejo y mezcla de orígenes, provocan en el cordero la elevación de los niveles de cortisol, con una consecuente caída de las defensas. Esta baja en muchas ocasiones se ve incrementada por la presencia de enfermedades concomitantes como: coccidiosis, infecciones víricas, conjuntivitis, parasitosis respiratorias y digestivas, etcétera (González, 2008).

Las defensas del organismo se ven afectadas ya que el cortisol disminuye la producción de Interleucina-1 (IL-1), al reprimir la expresión del gen de esta linfocina. De este modo, el cortisol puede bloquear toda la cascada de la inmunidad mediada por células, así como la generación de fiebre; también estabiliza la membrana de los lisosomas por lo tanto, reduce la liberación de enzimas capaces de degradar cuerpos

extraños y bloquea el reclutamiento de neutrófilos al inhibir su capacidad para ligar péptidos quimiotácticos. El cortisol altera además la capacidad fagocítica y antibacteriana de los neutrófilos, disminuye la proliferación de los fibroblastos y su capacidad para sintetizar y depositar fibrillas tisulares, evitando así la encapsulación de los invasores (Villalobos, 2003).

Los factores ambientales son junto con los estresantes los más importantes en la aparición del complejo respiratorio. Se pueden dividir en factores ambientales ligados a la explotación y factores climáticos (González, 2008).

I.8. Cuadro clínico.

La enfermedad clínica generalmente no ocurre hasta seis a diez días después de que el ganado sufrió una situación de estrés o algunos animales nuevos fueron introducidos al hato. Los primeros signos observables son ligera depresión e inapetencia, manifestados por enflaquecimiento. Los animales afectados a menudo se apartan del resto del grupo con la cabeza agachada, orejas caídas y ojos medio cerrados, como si dormitaran. En las primeras etapas no existe disnea; sin embargo, la tasa respiratoria puede ser elevada cuando existe fiebre alta, especialmente cuando la temperatura ambiental aumenta. El hocico puede estar seco y con costras. La descarga nasal puede o no estar presente, ya que es más indicativa de la severidad de la enfermedad viral predisponente del aparato superior que de la neumonía. La tos nunca es un signo prominente y es generalmente suave, húmeda y ocasionalmente se exacerba (Olguín, 2007).

La severidad de los signos clínicos pueden variar de inaparentes a una enfermedad rápida y fatal, pero algunas características pueden ser mencionadas: hay siempre un cierto grado de depresión y anorexia, fiebre de hasta 42° C, ritmo cardiaco aumentado hasta cinco veces lo normal, una substancial pérdida de peso y rinitis resultando en una descarga nasal mucopurulenta o seca. Lagrimación incrementada y tos están a veces presentes. La auscultación revela sonidos vesiculares y bronquiales incrementados en la zona anteroventral (Zecchinon *et. al.*, 2005).

La fisiopatología de todas las neumonías, independientemente del modo en que se desarrolla la lesión se basa en la interferencia del intercambio gaseoso entre el aire alveolar y la sangre, se producen entonces anoxia e hipercapnia, que ocasionan polipnea, disnea o taquipnea. Una forma útil de evaluar la severidad de la enfermedad respiratoria

es escuchar con el estetoscopio la zona de auscultación pulmonar en diferentes puntos para contrastar los sonidos de las partes ventrales y dorsales. Los pulmones sanos son relativamente silenciosos en todos sus puntos, debido que el aire se mueve libremente dentro de ellos. Los desechos y la inflamación en los pulmones infectados interfieren con el flujo del aire, provocando sonidos respiratorios más fuertes de lo normal, especialmente sobre la cara anteroventral de los pulmones, detrás del hombro, salvo que exista derrame pleural para amortiguar los sonidos. En las neumonías bacterianas existe el efecto adicional de las toxinas producidas por las bacterias y el tejido necrótico; la acumulación del exudado inflamatorio en los bronquios se manifiesta por sonidos respiratorios anormales, como crepitaciones o sibilancias a la auscultación. La neumonía intersticial produce condensación del parénquima pulmonar sin afectar los bronquios y en la auscultación predominan los sonidos altos en las primeras fases (Olguín, 2007).

I.9. Patogenia de la manheimiosis neumónica.

M. haemolytica es un habitante normal de las criptas de tonsilas de bovinos y ovinos sanos, además, es un importante agente oportunista del tracto respiratorio debido a que usualmente coloniza la parte alta de este y bajo ciertas condiciones de inmunosupresión del huésped, así como del ambiente, llega a afectar sus mecanismos de defensa, lo cual permite que la bacteria se establezca y se multiplique rápidamente, y es eliminada por las secreciones nasales en aerosoles. La bacteria ingresa a un animal sano, favoreciendo que penetre a los pulmones durante la inhalación e inicie una infección activa en el epitelio alveolar (Jaramillo *et al.*, 2009).

Los mecanismos importantes en la inmunidad de los ovinos hacia *M. haemolytica* están mediados por el complemento, la opsonización de la bacteria y la fagocitosis por neutrófilos (Leite *et al.*, 2002). Los fagocitos realizan una labor de gran importancia, ya que son los principales productores de las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α y además liberan otras moléculas como: la enzima activadora de plasminógeno, fosfolipasa y mediadores lipídicos de inflamación, tales como prostaglandinas y leucotrienos (Hernández *et al.*, 2001). Un potente mediador inflamatorio de la neumonía por *M. haemolytica* en rumiantes es la interleucina IL-8. Esta interleucina se produce por células endoteliales, células epiteliales, macrófagos activados y neutrófilos

causando la activación y quimiotáxis de estos últimos al sitio de lesión (Caverly *et. al.*, 2003).

I.10. Lesiones pulmonares.

I.10.1. Lesiones macroscópicas.

La mannheimiosis ocasiona un cuadro de neumonía aguda lobar fibrinonecrotizante, que se caracteriza por depósitos de fibrina entre los lóbulos, exudado pleural en la cavidad pulmonar y áreas de necrosis a través de los lóbulos. En la enfermedad del complejo respiratorio, debido a la infección por *M. haemolytica*, es común encontrar una extensa permeabilidad vascular en los alvéolos (Contreras, 2005; Mc Clenahan *et. al.*, 2007).

La información aportada por las lesiones en los corderos es mucho más confiable que el cuadro clínico observado. El estudio de las lesiones requiere una necropsia completa (sistema respiratorio y resto del cordero) o la inspección en el rastro (pulmones y canales). El estudio completo del sistema respiratorio debe extenderse desde las fosas nasales hasta el pulmón, inspeccionando todos los órganos linfoides regionales. Para realizar de manera correcta las necropsias, lo más importante es contar con una técnica sistematizada y recoger los datos en una ficha, acompañando a la misma con los resultados de los análisis realizados (histológicos y/o microbiológicos). Desde un punto de vista práctico, las lesiones se pueden clasificar en: procesos septicémicos, agudos o crónicos, sin embargo, los límites son difíciles de establecer. Los hallazgos macroscópicos entre los diferentes tipos de neumonías en ocasiones son relativamente fáciles de observar pero en la mayor parte de los casos no son apreciables y requieren de estudios histológicos. Una aplicación muy importante de los estudios histológicos, desde el punto de vista práctico, recae en la determinación de lesiones de neumonía intersticial compatibles con la presencia de *Mycoplasma* sp. y/o infecciones virales asociadas pues en ocasiones las pruebas microbiológicas dan falsos negativos frente a ellos. Las formas septicémicas (muertes repentinas sin signos previos) se caracterizan por hemorragias a todos los niveles, no obstante la mayor parte de las lesiones se concentran en cabeza y cuello. En el examen externo se aprecian hemorragias y en ocasiones salida de fluidos sanguinolentos o espumosos por fosas nasales. La presentación de formas crónicas es muy variable y va desde corderos en buenas condiciones que llegan al rastro con un

peso adecuado pero con lesiones proliferativas a nivel pulmonar, hasta enfermos con un cuadro evidente de cronicidad. Estos últimos presentan un mal aspecto general, con escaso peso y presencia de signos. Las lesiones se concentran en la cavidad torácica con lesión pulmonar consolidada y es habitual la presencia de adherencias pleurales fibrosadas. En ocasiones, las lesiones pueden reagudizarse ante factores estresantes provocando la muerte del cordero; en estos casos es fácil observar hemorragias sobre dichas zonas. Las formas crónicas que se observan en el rastro representan la mayor parte de las lesiones de síndrome respiratorio, suponiendo cuatro quintas partes del total de lesiones. Esto puede explicar en parte la escasa concientización de los ganaderos ante la enfermedad ya que en pocas ocasiones reciben información sobre estas lesiones y cuando la reciben no suelen reducir el precio de venta de sus productos. Por lo tanto se dice que: *el síndrome respiratorio es una enfermedad silenciosa. Por cada animal que presenta síntomas y lesiones existen al menos cuatro que no presentarán signos y sí severas lesiones* (González, 2008).

Las formas agudas son cuadros intermedios y difíciles de clasificar, pudiendo estar más cerca de las formas septicémicas o de las formas crónicas. Por lo general, son los corderos los que presentan los signos clásicos como fiebre, debilidad, golpe del ijar y anorexia. Una manera práctica de diferenciarse de las otras dos formas de presentación puede ser la presencia de hemorragias en mayor cantidad que en las formas crónicas y a su vez presencia de lesiones pulmonares consolidadas a diferencia de las formas septicémicas (González, 2008).

I.10.2. Lesiones microscópicas.

Los efectos citotóxicos de *M. haemolytica* en el macrófago alveolar, pueden también contribuir con la severidad de daño pulmonar, al tener los macrófagos factores de descarga que causan irritación y deposición de fibrina. Además, la habilidad de las bacterias para debilitar al macrófago y linfocitos puede ser importante en el inicio de la enfermedad. La neumonía causada por *M. haemolytica* se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa severa, sin embargo, se ha logrado aislar este agente de cuadros neumónicos que varían en cuanto a su severidad, distribución y morfopatología. En estos cuadros se pueden encontrar desde neumonías supurativas focales y difusas, hasta cuadros donde existen lesiones vasculares con trombosis y

hemorragias, en los que adicionalmente se puede observar la transformación de macrófagos dando un aspecto arremolinado o de "avena". Se cree que este último cambio se debe al efecto tóxico de la leucotoxina que produce *M. haemolytica* (Morales, 1997).

I.11. Diagnóstico.

Para la detección e identificación de *M. haemolytica* se cuenta con diversas técnicas de laboratorio que incluyen el aislamiento bacteriano, su fenotipificación, serotipificación y genotipificación (Jaramillo *et. al.*, 2009).

Para el aislamiento y fenotipificación se utiliza el cultivo *in vitro* en medios a base de agar sangre, además de pruebas bioquímicas, todo lo cual permite determinar la morfología de las colonias, la producción de hemólisis, así como su comportamiento bioquímico para efectos de su identificación y biotipificación (Angen *et. al.*, 1999; Biberstein, 1978). Además de los métodos convencionales disponibles para la identificación bioquímica de *M. haemolytica*, se dispone de otros métodos alternativos, que se basan en sistemas miniaturizados disponibles comercialmente y que facilitan y agilizan la fenotipificación; entre ellos se encuentra el sistema API 20E y 20NE, tabletas diagnósticas y el sistema OxiFerm, que se han usado ampliamente como una herramienta en la identificación de enterobacterias y no enterobacterias en medicina veterinaria, con resultados muy satisfactorios (Oberhofer, 1979; Swanson *et. al.*, 1980; Collins *et. al.*, 1981; Erasmus, 1983; Angen *et. al.*, 2002 Villard *et. al.*, 2006; Katsuda *et. al.*, 2006).

Para la serotipificación se emplean técnicas de hemoaglutinación indirecta con antisueros de referencia específicos para los 12 serotipos reconocidos. Otra prueba serológica que se puede utilizar es la técnica de ensayo visual simple a partir de la obtención de LKT de aislamientos de *M. haemolytica*, para determinar la presencia de anticuerpos anti-LKT en el suero de los animales problema; de igual manera, mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia, a partir de proteínas obtenidas de la membrana externa de *M. haemolytica*, que se emplean como antígenos para determinar el patrón de reconocimiento por anticuerpos contra dichos antígenos (Biberstein, 1978).

La variabilidad y complejidad de las características fenotípicas y genotípicas del género *Mannheimia* dificultan en gran medida la clasificación de los aislamientos a través de las técnicas de laboratorio rutinarias, basadas en criterios descriptivos convencionales, que hacen imposible la clasificación taxonómica precisa. Las técnicas clásicas para la identificación de bacterias, tales como la biotipificación, serotipificación, determinación de patrones de susceptibilidad a antibióticos y fagotipificación, se basan en diferencias fenotípicas. No obstante, estas técnicas se ven limitadas por la capacidad de las bacterias de alterar de manera impredecible la expresión de algunas de sus características, de tal manera, que aislamientos de una misma cepa pueden variar fenotípicamente; adicionalmente, algunos de estos métodos son poco precisos por la relativa gran cantidad de cepas que son fenotípicamente nulas, es decir, no tipificables (Maslow *et. al.*, 1993; Versalovic *et. al.*, 2002).

Los métodos fenotípicos para la caracterización de las especies de *Mannheimia* se han utilizado durante mucho tiempo y aunque se acepta que su reproducibilidad es alta, sus limitaciones ya han sido reconocidas ampliamente (Chaslus *et.al.*, 1996; Angen *et. al.*, 2002).

En estudios realizados para evaluar la especificidad de la serotipificación como una herramienta diagnóstica, se ha demostrado que no es un método confiable para la correcta identificación de *M. haemolytica*, y se hace énfasis sobre la necesidad de una amplia caracterización fenotípica y genotípica para la adecuada tipificación de este microorganismo, considerando las dificultades que han presentado otros estudios para su clasificación, basada solamente en la fenotipificación y la serotipificación, teniendo en cuenta que el género *Mannheimia* abarca taxones de una gran heterogeneidad fenotípica y genotípica (Angen *et. al.*, 1999; Angen *et. al.*, 2002; Poulsen *et. al.*, 2006).

Es evidente que los estudios sobre caracterización epidemiológica requieren del uso tanto de los métodos fenotípicos como genotípicos. Diversas técnicas de biología molecular han demostrado su utilidad en el estudio de la taxonomía, patogénesis y epidemiología de *M. haemolytica*. Entre las técnicas empleadas en diversas investigaciones sobre la epidemiología molecular de aislamientos de *M. haemolytica* se pueden destacar el análisis de restricción para la detección de los genes del ARNr o

ribotipificación, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de endonucleasas de restricción (REA) del ADN cromosomal, hibridación de ADN-ADN, electroforesis de enzimas multilocus (EEML), amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD), secuenciación del ADN, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Todos estos métodos tienen como base el estudio del polimorfismo del ADN bacteriano y se ha demostrado su alto poder de discriminación para la diferenciación de cepas, superior a los métodos convencionales de tipificación fenotípica (Maslow *et. al.*, 1993; Chaslus *et. al.*, 1996; Angen *et. al.*, 1999; Liu *et. al.*, 1999; Derosa *et. al.*, 2000; Angen *et. al.*, 2002; Versalovic *et. al.*, 2002; Poulsen *et. al.*, 2006).

I.12. Prevención y control.

Dada la complejidad que involucra esta enfermedad multietiológica, las medidas de prevención y control siguen siendo motivo de análisis y polémica respecto de su eficacia y la eficiencia de la inmunización, el empleo de quimioterapéuticos y el control de factores ambientales que propician el estrés en los animales favorecen la acción invasora de *M. haemolytica* a través de sus complejos mecanismos de virulencia. Tradicionalmente, el tratamiento se ha basado en el uso intensivo de antibióticos, incluyendo además, el tratamiento masivo de hatos, lo cual ha determinado un incremento en la incidencia de cepas multirresistentes de *M. haemolytica*. De ahí que sea preferible una prevención y control de la enfermedad, basada más en la vacunación que en la quimioterapia (Highlander, 2001). La selección de los antimicrobianos a emplear, raramente se basa en estudios previos de sensibilidad *in vitro* de cepas aisladas a partir de exudado nasal o traqueal, considerando además, que estos aislamientos no reflejan necesariamente los microorganismos presentes en el tejido pulmonar (Allen *et al.*, 1991).

Desde los primeros estudios llevados a cabo en enfermedades causadas por microorganismos, quedó demostrado que la infección con un organismo potencialmente patógeno seguida por la supervivencia del hospedador, estaba asociada con el desarrollo de una respuesta inmune, que además protegía al individuo de enfermedades subsecuentes causadas por microorganismos similares. Cabe recordar que una de las

características principales del sistema inmune adaptativo es la capacidad de generar “memoria inmunológica”, aspecto importante que se busca potenciar con la aplicación de vacunas (Baraibar, 2006).

La vacuna ideal es aquella que es altamente inmunogénica y que induce inmunidad a lo largo de la vida. Esta debe ser sencilla de administrar, preferentemente en una única dosis y que no produzca efectos adversos. Ninguna de las vacunas que se encuentran disponibles en el mercado posee todas estas características (Baraibar, 2006).

La vacunación es la forma más eficaz de prevenir enfermedades infecciosas. El control de muchas enfermedades de los animales a través de la vacunación es probablemente el más prominente logro de la medicina veterinaria (Baraibar, 2006).

Un ejemplo representativo de bacterina son utilizadas para la prevención de la septicemia hemorrágica y *fiebre de embarque* cuyos agentes causales son *Pasteurella multocida* y *M. haemolytica*, entre otros (Baraibar, 2006).

Las vacunas son una herramienta valiosa en la prevención de enfermedades infecciosas, debiéndose considerar los factores bacterianos, y del laboratorio que la produce, además son de un enorme beneficio a la salud de los animales (Reséndiz *et al.*, 2007).

La capacidad de las MVs para estimular una respuesta inmune y una memoria adaptativa ya ha sido explotada en el desarrollo eficaz de vacunas acelulares basadas en uso de las MVs. Su mayor éxito como vacuna, se desarrolló en la elaboración de un biológico vacunal contra el serotipo B de *N. meningitidis*. Las propiedades de esta vacuna han sido revisadas exhaustivamente por Holst *et al.* (2009).

Como se detalla en dicho análisis, las vacunas basadas en las MVs han demostrado ser la única formulación de protección contra infecciones del serogrupo B, con más de 55 millones de dosis administradas hasta la fecha. Existen varias formulaciones diferentes de esta vacuna, dirigido a las cepas y antígenos específicos de un área geográfica dada en la región. Todas las preparaciones vacunales con MVs de *Neisseria meningitidis*, estimulan anticuerpos, con lo cual se da una respuesta sistémica y de

protección local de mucosas, induciendo respuesta de anticuerpos principalmente contra porinas PorA y PorB de membrana externa de la bacteria (Frasch, 1990).

La ingeniería actual enfocada a la investigación de cepas de *N. meningitidis* productoras de vesículas de membrana externa, ha demostrado la presencia de múltiples proteínas PorA derivadas de cepas diferentes. Estos estudios se continúan actualmente con la esperanza de desarrollar una vacuna global de *N. meningitidis* serogrupo B que incluya los principales antígenos de los diferentes serotipos (Van den Dobbelsteen *et al.*, 2007).

Por otro lado, Schild *et al.*, (2008) utilizaron un modelo de transferencia pasiva de anticuerpos en ratones neonatos, para demostrar que la inmunización con las MVs de *Vibrio cholerae* en estos animales generan una respuesta protectora de anticuerpos. Las respuestas de células B a las MVs de *Salmonella Typhimurium*, *Borrelia burgdorferi* y *Flavobacterium* también han sido documentadas, indicando en todos los casos, la facilidad para utilizar MVs como sistemas de liberación de antígenos para generar respuestas eficaces de anticuerpos (Whitmire *et al.*, 1993; Alaniz *et al.*, 2007; Aoki *et al.*, 2007).

La presencia de LPS en MVs utilizadas como vacunas, ha acentuado la capacidad de este para actuar como un adyuvante natural ante el sistema inmunológico. *Neisseria* es un patógeno Gram negativo que puede tolerar la delección de la biosíntesis de los genes para LPS. Sin embargo, la respuesta inmune ante preparaciones de MVs libres de LPS es pobre y la adición de patrones moleculares de reconocimiento antigénico (PAMPS) como adyuvantes exógenos mostraron ser necesarios para generar una respuesta inmune óptima en el hospedador (Durand *et al.*, 2009; Fransen *et al.*, 2007; Opal *et al.*, 2005).

La vacuna comercial de MVs más comúnmente usada es a partir de *N. meningitidis*, en la cual se utilizan vesículas elaboradas por la bacteria al ser tratada con detergentes, con lo cual se reduce drásticamente el efecto tóxico más no se elimina por completo el contenido endotóxico (LPS) de las vesículas. Los datos generados del uso vacunal de MVs deficientes de LPS, así como la observación de la presencia de una adhesina (NadA) de *Neisseria*, generan una respuesta inmune eficaz sólo cuando se asocian con LPS, lo cual indican su actividad como adyuvante (Blander *et al.*, 2006).

Recientes investigaciones sobre cómo el ligando del TLR (receptores tipo *toll*) afecta otras funciones de los fagocitos como maduración fagosomal, la selección de antígenos para su presentación mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), y la maduración de células dendríticas, indican que el sistema inmune puede ser el que mejor se adapte a la detección de una "mezcla" de LPS y otros componentes bacterianos de membrana externa para generar una respuesta eficaz del hospedador (Blander *et. al.*, 2006).

Existe en el mercado una amplia gama de vacunas elaboradas a partir de MVs bacterianas, desafortunadamente no hay mucha difusión que sustenten su eficacia en estudios con desafíos controlados o en condiciones de campo (Highlander, 2001; Bowland *et. al.*, 2000).

Aparentemente, estas vacunas sólo aportan una protección parcial, incluso algunas, como las preparadas a base de células íntegras, pueden llegar a incrementar la morbilidad en el hato. Otra estrategia de prevención en lotes de engorda, ha sido el empleo de vacunas únicamente contra agentes virales, lo cual también ha resultado poco eficaz (Bowland *et. al.*, 2000).

El desarrollo de vacunas eficaces depende primordialmente del conocimiento detallado de los antígenos y factores de virulencia de *M. haemolytica*, necesarios para estimular una protección inmune. Estos antígenos incluyen componentes de la superficie bacteriana (LPS, OMP) además de moléculas secretadas (LKT) (Highlander, 2001).

Se ha podido demostrar una correlación entre los títulos de anticuerpos antileucotoxina neutralizantes y la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, el empleo de la LKT sola, purificada o recombinante, no ha sido suficiente para originar protección. De manera similar, el empleo de polisacáridos capsulares combinados con LKT tampoco ha generado protección. No obstante, el sobrenadante de cultivos mezclados con LKT recombinante ha sido eficaz en ensayos con animales desafiados, lo que sugiere que la mejor opción como vacuna sea la mezcla de LKT asociada con antígenos de sobrenadante (Conlon *et. al.*, 1991; Purdy *et. al.*, 1993; Highlander, 2001).

También se ha informado sobre algunos resultados exitosos mediante el uso de vacunas vivas. Sin embargo, existe la preocupación respecto a la posible virulencia de estas cepas (Pancieri *et. al.*, 1984; Confer *et. al.*, 1985).

Estudios recientes se han enfocado a lograr la inducción de inmunidad local contra *M. haemolytica*, mediante la liberación de antígenos a través de la mucosa, reduciendo así la colonización de la nasofaringe por parte del microorganismo patógeno, ya sea mediante la expresión de antígenos de *M. haemolytica* en vectores virales, que facilitarían la replicación en el tracto respiratorio superior, o la administración oral de dichos antígenos encapsulados en microesferas de alginato, así como el desarrollo mediante ingeniería genética, de plantas para la expresión de antígenos de *M. haemolytica*, a fin de producir vacunas transgénicas para uso por vía oral (Bowersock *et. al.*, 1999; Lee *et. al.*, 2001; Rice *et. al.*, 2008).

Estos antígenos derivados de plantas fueron inmunogénicos cuando se inyectaron en conejos y también mediante vacunas orales estimularon una respuesta inmune en la mucosa de becerros (Lo, 2008).

Recientemente González *et al.* (2011) evaluaron la respuesta inmuno protectora inducida en corderos vacunados con MVs de *M. haemolytica* A2 por vía intranasal, donde paralelamente se comparó con la vacunación intramuscular de vacuna comercial que contenía células completas y toxinas de *M. haemolytica* A1 y *P. multocida* tipo D. Todos los animales recibieron doble inmunización y posteriormente fueron desafiados intra-traquealmente con el virus de *Parainfluenza* 3 y ocho días después, desafiados con una cepa patógena de campo de *M. haemolytica* A2. Se evaluó la respuesta de anticuerpos específicos sistémicos (Ig G) y de mucosa (Ig A), además del desarrollo de lesiones neumónicas al desafío. La inmunización intranasal con MVs de la bacteria indujo una elevada respuesta de Ig A e Ig G, observándose a la necropsia, que todos los animales de este grupo no desarrollaron lesiones características del proceso al desafío, correlacionando además los títulos de Ig A con el aislamiento de la bacteria tanto de vías respiratorias superiores como de pulmón, los cuales en ambos casos resultaron negativos. Estos resultados indican que la administración vía mucosa de MVs de *M. haemolytica* en corderos inducen una respuesta inmune protectora del 100% de los animales vacunados por esta vía con este antígeno, al desafío con una cepa homóloga del mismo serotipo.

II. JUSTIFICACIÓN

La protección que confiere la vacunación con MVs de *Mannheimia haemolytica* A2 por vía intranasal (I.N) ha resultado favorable, como se menciona en el trabajo previo “Evaluación y caracterización de microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 para su posible utilización como vacuna en ovinos (González *et al.*, 2012), ya que inducen una respuesta inmune protectora, tanto local (Ig A) como humoral (Ig G), en el desarrollo de lesiones neumónicas características de la enfermedad al desafío experimental (González *et al.*, 2012). Sin embargo, este biológico no había sido evaluado en campo. La enfermedad sigue persistente y con alta frecuencia en animales a nivel de unidades de producción. Los ovinos se siguen vacunando con biológicos comerciales de uso en bovinos, enriquecidos con diferentes serotipos de *M. haemolytica* que afectan a esta especie o bien combinación de esta con otras bacterias (*P. multocida*) y sus sobrenadantes o toxinas. Sin embargo, la enfermedad prevalece en los rebaños de ovinos, ya que la vacunación no garantiza la total protección del rebaño contra el desarrollo del proceso neumónico. Los factores extrínsecos así como las infecciones virales primarias, juegan un papel fundamental en el desarrollo y presentación de la enfermedad. Por lo tanto, contar con un inmunógeno eficaz que prevenga en condiciones de campo el desarrollo de la manheimiosis neumónica, elaborado con serotipos de significancia patológica en ovinos, permitirá contribuir a la prevención y control del proceso en el país, disminuyendo el impacto económico que esta enfermedad genera en el mismo (Gonzalez *et al.*, 2011).

HIPÓTESIS.

Si la vacunación experimental con microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* A2 en condiciones controladas en ovinos, ha resultado exitosa al inducir una buena respuesta inmune humoral local y sistémica; entonces aplicar la vacuna en condiciones de campo bajo los mismos criterios antes utilizados, permitirá desarrollar una adecuada respuesta inmune humoral protectora en los ovinos vacunados.

III. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar un inmunógeno elaborado con microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 en un rebaño de corderos de tres semanas de edad, en Zumpango, Estado de México.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Obtener MVs de *M. haemolytica* A2, a partir de sobrenadantes de cultivo.
- b) Comprobar la presencia de MVs de *M. haemolytica* A2, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).
- c) Medir la respuesta inmune humoral local y sistémica (Ig A , Ig G e Ig M) que induce el biológico de MVs de *M. haemolytica* A2 mediante ELISA en los corderos inmunizados
- d) Correlacionar la ganancia diaria de peso con los niveles de anticuerpos en los corderos tratados.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

VI.1. Localización.

El presente trabajo se realizó en un rebaño ovino ubicado en Zumpango, Estado de México. La unidad de producción cuenta con alrededor de 200 ovinos, los cuales se encuentran distribuidos por edad y sexo. Se utilizaron 60 corderos de tres semanas de edad, con peso promedio de 3 kg, de las razas Romanov, Charollais y Suffolk.

La parte experimental de laboratorio se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias en el Laboratorio de Bacteriología, ubicado en Cuajimalpa, Ciudad de México.

VI.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los 60 animales objeto de estudio, se ubicaron en tres grupos (Tabla 1). El grupo A, correspondió a animales vacunados con MVs de *M. haemolytica* A2 por vía intranasal (IN), el B correspondió a animales vacunados con un biológico comercial por vía intramuscular (IM) y el grupo C, correspondió a los animales del grupo testigo, a quienes se les aplicó solución salina fisiológica por vía IM e IN. A todos los animales, se les realizaron muestreos de sangre y de hisopo nasal dos veces por semana, durante 12 semanas. Con los primeros ocho muestreos se estableció la concentración basal de anticuerpos contra *M. haemolytica*, dado que es una bacteria saprófita-comensal de vías respiratorias altas. Al noveno muestreo se realizó la inmunización de los animales de acuerdo al grupo asignado. En el caso de los animales inmunizados con MVs se realizó una segunda inmunización ocho días después de la primera, según lo marca el calendario de inmunización.

Los animales inmunizados con vacuna comercial (One Shot Ultra 8, Zoetis) recibieron una sola dosis en el noveno muestreo por vía IM. , debido a que este es el calendario de vacunación que el productor aplica más no el que especifica el fabricante. El tratamiento que recibió el grupo testigo, correspondió a la aplicación de SSF por vía IM e IN como placebo. Posteriormente, a partir del noveno muestreo se obtuvo sangre para posteriormente separar el suero con la finalidad de establecer los

niveles de anticuerpos mediante el método de ELISA indirecto según el tratamiento asignado a los animales en estudio.

Los corderos del grupo B (vacunados con el producto comercial) se inmunizaron por vía intramuscular con un biológico comercial (One Shot, Zoetis) que tenía las siguientes características: Bacterina-toxoide inactivada, deshidratada y preparada a partir de cultivos de células completas de *M. haemolytica* serotipo A1, que incrementan la producción de leucotoxina y antígenos capsulares asociados. Contiene un diluyente estéril y un adyuvante constitutivo que aumenta la respuesta inmune, especificado en la etiqueta del producto.

VI.3. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Se utilizó una cepa de campo serotipo A2, la cual se obtuvo en un trabajo previo a partir de un animal muerto por neumonía, muestreado en campo.

VI.4. Obtención de microvesículas bacterianas (MVs).

Se realizó la siembra de *M. haemolytica* en cajas de agar sangre, incubándose a 37° C durante 24 horas. Posteriormente se obtuvo una colonia y se resembró nuevamente en agar sangre por estría cerrada alrededor de cuatro cajas por cada 500 ml de medio líquido BHI.

Al término del crecimiento de 24 horas en las cajas de agar sangre, se procedió a cosechar la bacteria con el mismo medio BHI, mismo que al terminar de separar las colonias del agar se añadió a los 500 ml de medio líquido BHI adicionado con 2 ml de ClCa_2^+ . Este medio se mantuvo en agitación durante 24 horas a 37° C, lo cual corresponde al tiempo en el que el cultivo se encuentra en fase de crecimiento logarítmico; al término de este tiempo se agregaron 10 μl de gentamicina por ml de cultivo y se completó la incubación hasta las 48 horas. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 9000 x g por 15 minutos para eliminar la biomasa y recuperar el sobrenadante de cultivo, el cual se hizo pasar por filtros Millipore de 0.45 y 0.22 μm de poro. El sobrenadante se ultracentrifugó a 150,000 x g por 3 horas. Al término se eliminó el sobrenadante y se recuperó la pastilla en un total de 2 ml de agua desionizada. Esta pastilla en la cual se encuentran las MVs, se congeló a -70° C hasta su uso

(Kadurugamuwa *et al.*, 1995). El procedimiento con dichas cepas, para la obtención de MVs se muestra en la **Figura 5**.

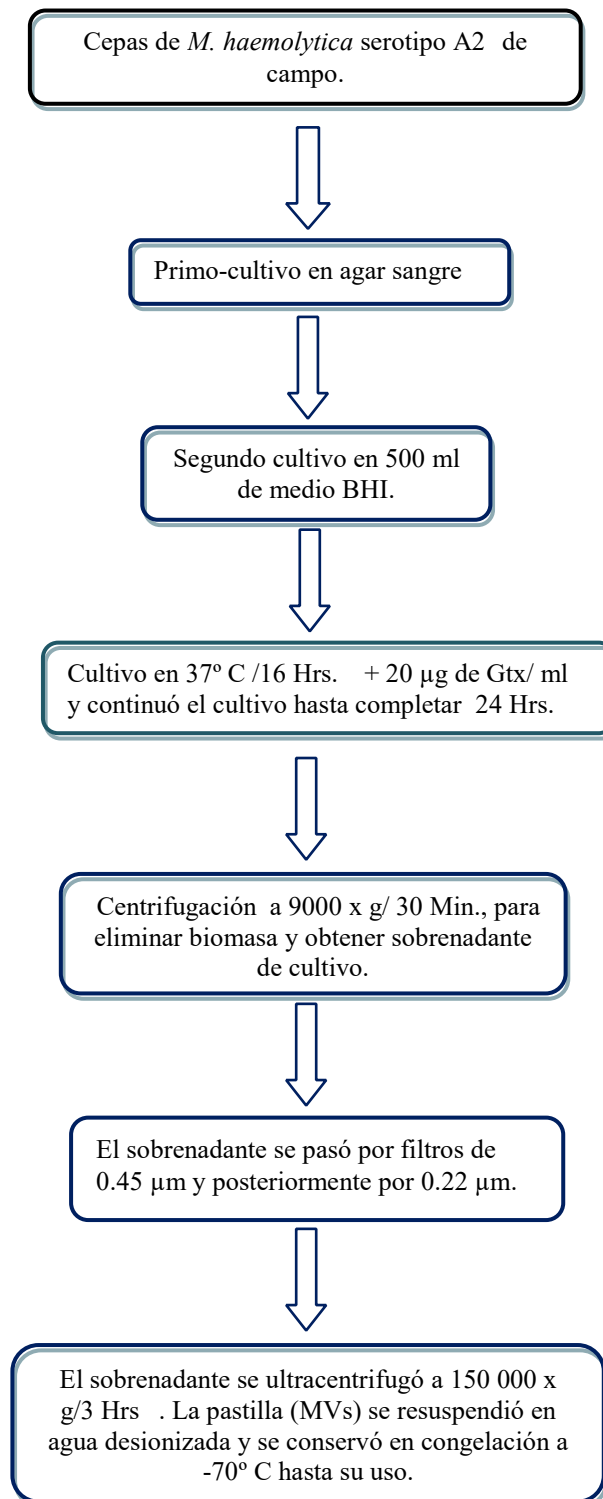


Figura 5. Procedimiento para la obtención de MVs de *M. haemolytica* A1 y A2.

Para estandarizar la concentración y observar la presencia de MVs, se realizó el método de Bradford (1976), y SDS-PAGE (Laemmli, 1970) respectivamente. Posteriormente se llevó a cabo la inmunización de los animales por vía intranasal para su posterior evaluación.

VI.5. Corrimiento electroforético de proteínas membranales de MVs de *M. haemolytica*.

La separación analítica de las proteínas de la fracción de membrana externa y de las MVs, se hizo en función de sus pesos moleculares, utilizando SDS-PAGE por el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se ajustó la concentración de proteínas necesaria a utilizar en el corrimiento electroforético, tanto de la fracción de membrana externa, así como de las MVs completas.

Se resuspendieron en Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas, ajustando el volumen 1:1 con el amortiguador de muestra Laemmli para posteriormente someterse a ebullición (95° C) durante 10 minutos. A continuación se colocó la muestra en cada carril en geles al 12% y estos se corrieron a un voltaje de 80 volts para alinear la muestra en el gel concentrador y 100 volts para el gel separador en solución amortiguadora de corrida. Los geles se tiñeron con azul de Comassie durante una hora a temperatura ambiente y en agitación suave, posteriormente se sometieron a una solución desteñidora, hasta visualizar claramente las bandas deseadas y finalmente estos se conservaron en ácido acético al 10%.

VI.6. Preparación del biológico vacunal.

La preparación del biológico vacunal de MVs se realizó a partir de 10 ml de MVs, al cual se le añadió la misma cantidad de agua desionizada estéril y se ajustó el pH a 2.7 con la ayuda de ácido clorhídrico. Le fue adicionado un adyuvante elaborado a partir de nanopartículas formadas por 100 µl de polietilcianoacrilato estabilizado con Pluronic F68 al 1% como tensoactivo (0.3g) y con agitación a 500 rpm durante 20 minutos. La mezcla se mantuvo en agitación a 500 rpm durante una hora, posteriormente se ajustó el volumen a 30 ml, con lo cual quedó lista para ser administrada. Las nanopartículas resultantes tenían un tamaño promedio de 110 nm y

una carga superficial de -20 Mv, como se muestra en la **Figura 6**. El tamaño y la carga de las nanopartículas se determinaron por medio de un equipo Malvern.

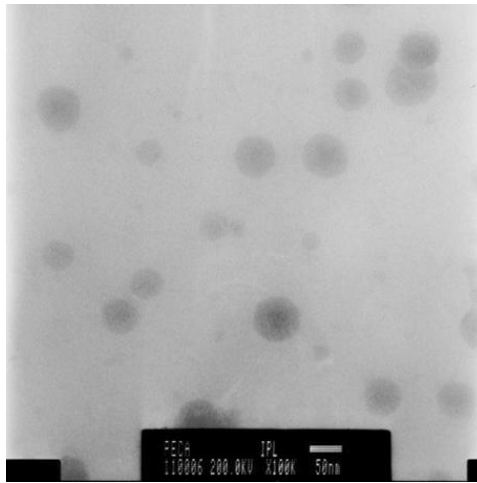


Figura 6. Biológico vacunal (nanopartículas y MVs de *M. haemolytica*) mostrando el tamaño de las nanopartículas comparado con el de las MVs

VI.10. Aplicación del biológico vacunal de Microvesículas.

El total del biológico vacunal antes preparado se colocó en un disparador nasal con el cual se administró la cantidad de 200µl por animal (50 µl por disparo) por vía nasal a cada animal perteneciente al grupo de animales vacunados con MVs.

VI.11. Colección y procesamiento de muestras (Sangre y moco nasal).

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por venopunción yugular en tubos al vacío sin anticoagulante. Todas las muestras fueron centrifugadas para separar el suero que fue congelado hasta su uso, con el cual se determinaron anticuerpos del tipo IgM e IgG, mediante la técnica de ELISA indirecta.

El moco nasal se obtuvo mediante hisopo estéril, directamente de la cavidad nasal, el cual se resuspendió en 1.5 ml de SSF y posteriormente se centrifugó para eliminar contaminantes y el sobrenadante se sometió a la técnica de ELISA indirecto para evaluar la concentración o títulos de anticuerpos de tipo IgA.

VI. ELISA indirecta.

La prueba de ELISA indirecta, se realizó considerando como títulos basales de IgA, IgM e IgG, aquellos determinados durante los primeros ocho muestreos, dado que los ovinos no son animales libres de *Mannheimia haemolytica*. Como ya se menciono anteriormente, esta bacteria reside en las vías respiratorias superiores y bajo el menor estímulo de inmunosupresión, prolifera y termina con la invasión del tejido pulmonar. Por tanto, al carecer de animales libres de la bacteria, la evaluación inmunológica parte del título obtenido durante los primeros ocho muestreos.

Metodología para montar la placa.

Se colocaron 10 µl de antígeno (Células completas), 90 µl de buffer de carbonatos (pH de 9.6) por pozo y se dejó en refrigeración toda la noche.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-T, 100 µl por pozo, se bloqueó la placa con gelatina al 3% en PBS, 100 µl por pozo y se incubó una hora a 37° C. Se realizaron cinco lavados con PBS-T, 100 µl por pozo, se dejó secar y se refrigeró toda la noche.

Se colocaron 100 µl por pozo de los sueros problema, a una dilución de 1:100 el cual se incubó una hora a 37° C. para la realización de cinco lavados con PBS-T, 100 µl por pozo.

Se adiciono el anti-IgG, anti-IgM o anti-IgA, según el caso, 100 µl por pozo a una dilución de 1:5,000 y se dejó incubar una hora a 37° C para posteriormente realizar cinco lavados con PBS-T, 100 µl por pozo y asi poder colocar el sustrato, 100 µl por pozo.

El sustrato utilizado consto de:

- a) Peróxido de hidrogeno al 1%.....100 µl
- b) Buffer sustrato (fosfato de sodio).....10 ml
- c) 3 ácido aminosalicílico.....10 mg

Se dejó incubar por 45 minutos a temperatura ambiente y se paró la reacción con 50 µl de hidróxido de sodio 3 M (NaOH 3 M) por pozo, para asi proceder a leer la placa en el lector de ELISA, a una absorbancia de 490 nm.

Calendario de inmunización.

Tabla 1. Calendario de tratamientos aplicado a los diferentes grupos de corderos.

Gpo.	Ag. Via de administracion	Muestreo de IgM, IgG e IgA (Sangre e Hisopo)	Niveles basales	Vac
A n= 20	MVs (IN)	1, 3, 8, 10, 15, 17, 22, 24, 29, 31, 36, 38, 43, 45, 50, 52, 57, 59, 64, 66, 71, 73, 78, 80.	1, 3, 8, 10, 15, 17, 22, 24.	29, 36.
B n=20	V.Com (IM)	1, 3, 8, 10, 15, 17, 22, 24, 29, 31, 36, 38, 43, 45, 50, 52, 57, 59, 64, 66, 71, 73, 78, 80.	1, 3, 8, 10, 15, 17, 22, 24.	29
C n=20	SSF (IM)	1, 3, 8, 10, 15, 17, 22, 24, 29, 31, 36, 38, 43, 45, 50, 52, 57, 59, 64, 66, 71, 73, 78, 80.	1, 3, 8, 10, 15, 17, 22, 24.	29

Gpo: Grupo

Ag: Antígeno vacunal

n: Número de animales.

IN: Intranasal.

IM: Intramuscular.

Vac: Vacunación

RESULTADOS.

IX.1. Caracterización de antígenos en MVs.

Se realizó corrimiento electroforético mediante SDS-PAGE al 12% (**Figura 7**) para evidenciar la presencia de las diferentes proteínas antigénicas acarreadas por las MVs de la bacteria que se caracterizaron en trabajos anteriores (González *et al.*, 2007), con pesos moleculares de 104, 60, 54, 45 y 25 kDa respectivamente, las cuales se señalan con flechas en el carril del gel que corresponde a las MVs. Se utilizó un patrón estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos, lo cual permitió establecer los tamaños moleculares de las diferentes proteínas identificadas.

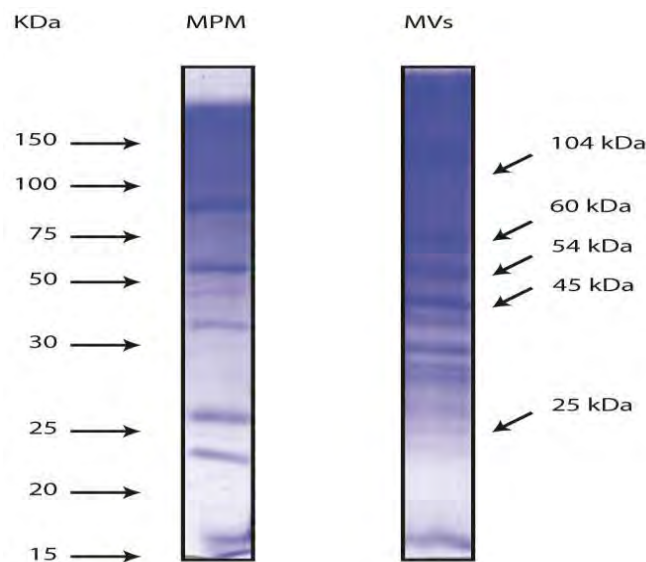
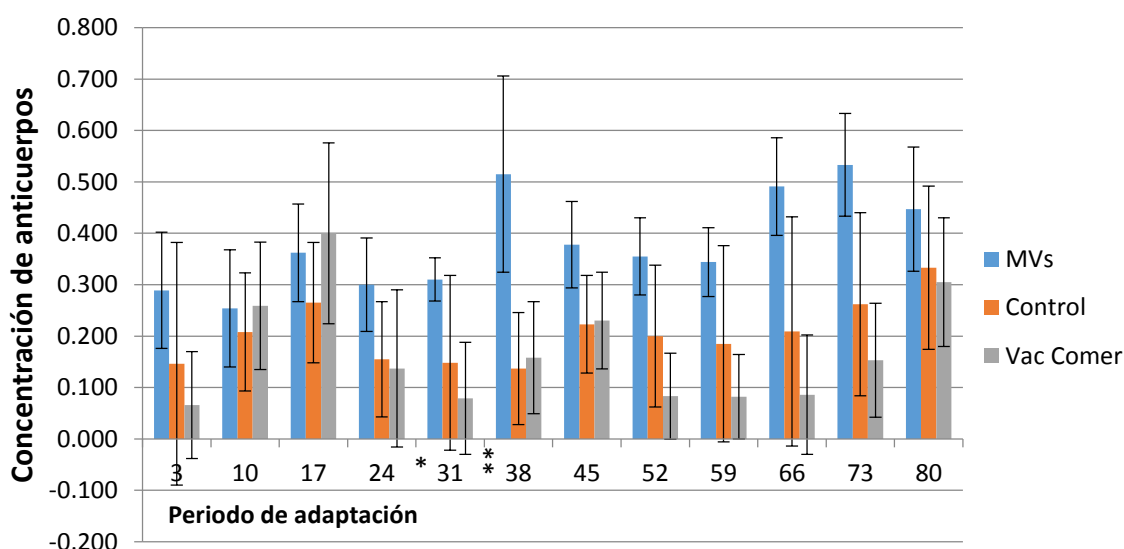


Figura 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%, presencia de las diferentes proteínas acarreadas por las MVs de *M. haemolytica*. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular estándar. En el segundo carril se corrió una alícuota que de MVs, en el cual se aprecian las proteínas de interés inmunogénico identificadas.

La prueba de ELISA indirecta, se realizó considerando como niveles basales tanto de IgA, IgM e IgG, aquellos determinados durante los primeros 8 muestreos, esto, por la razón de que los ovinos no son animales que se encuentran libres de *M. haemolytica*. Es de importancia mencionar que hubo una marcada diferencia ($p>0.05$) entre las medias de IgM, entre los tres diferentes grupos de animales.

En el caso de los niveles de IgM (**Figura 8**), es durante el día 38, que estos títulos se elevan considerablemente en el caso de los animales del grupo de vacunados con MVs, en comparación con los otros dos grupos de animales.

Figura 8. Evaluación y comparación de los títulos de anticuerpos mediante ELISA INDIRECTA de IgM de los 3 grupos experimentales.



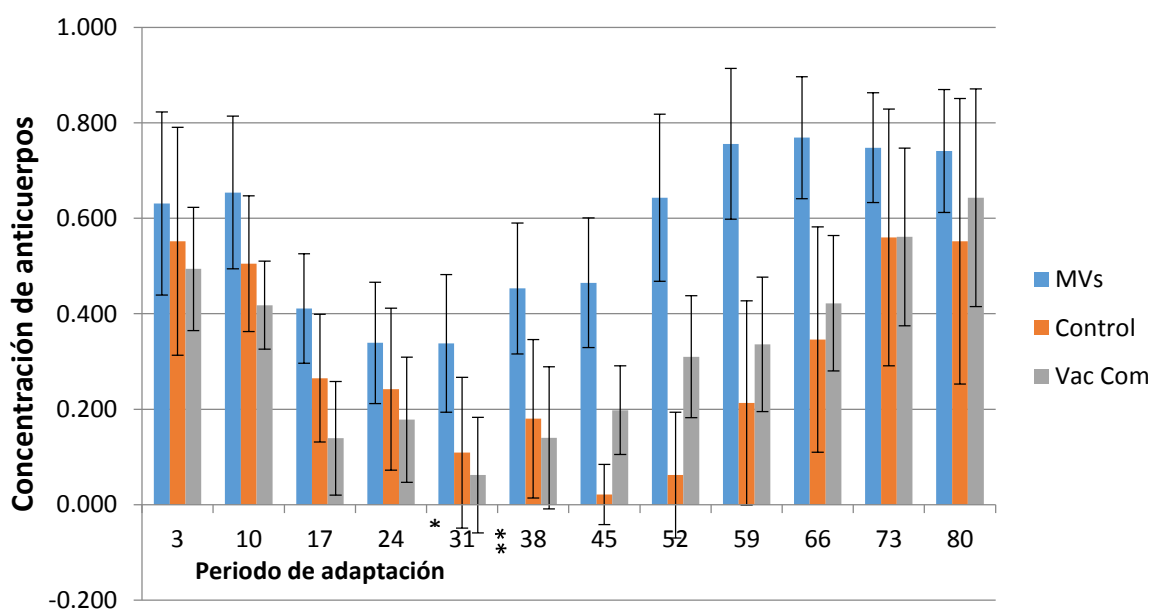
*1° Inmunización (Día 29)

** 2° Inmunización (Día 36) solo con MVs.

Periodo de adaptación (Día 1 al 28)

Durante el día 38 del experimento (**Figura 9**), los títulos de anticuerpos de tipo Ig G en los grupos de animales vacunados con MVs y vacunados con la vacuna comercial empiezan a elevarse, aunque existe una marcada diferencia entre estos dos grupos. La cual nos arroja que los animales de grupo vacunado con MVs obtuvieron una excelente respuesta inmune a partir de la primera inmunización, reafirmando esta respuesta a partir de la segunda inmunización, respuesta que se mantiene hasta el final del experimento.

Figura 9. Evaluación y comparación de los títulos de anticuerpos mediante ELISA INDIRECTA de IgG de los 3 grupos experimentales.



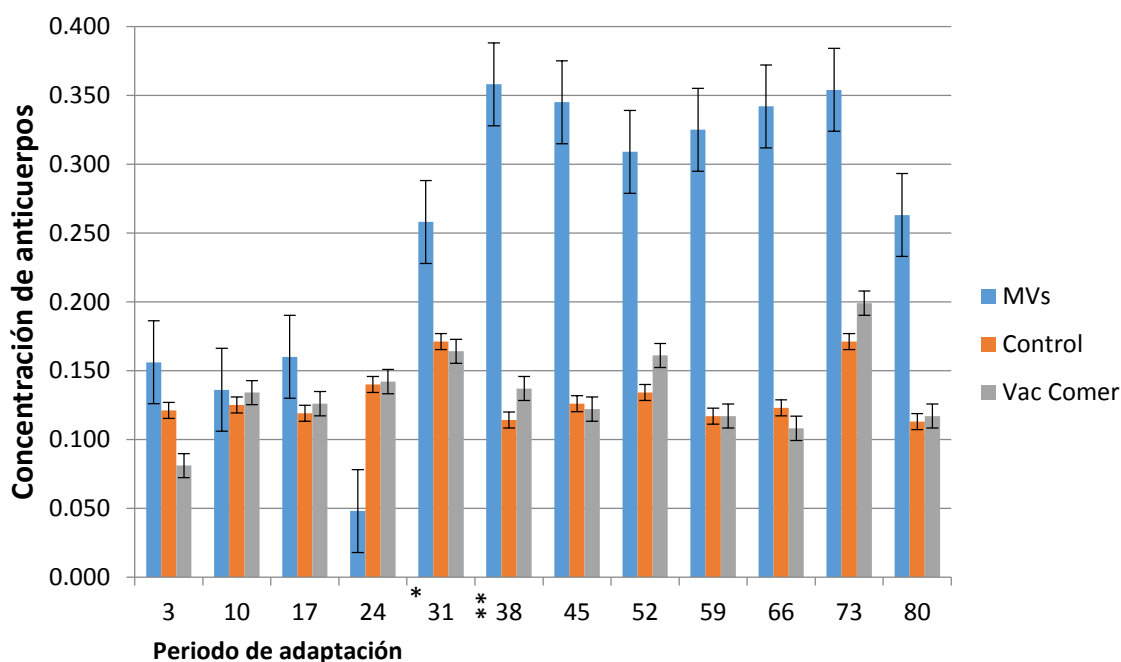
*1° Inmunización (Día 29)

** 2° Inmunización (Día 36) solo con MVs.

Periodo de adaptación (Día 1 al 28)

En el caso de los títulos de anticuerpos de tipo IgA (**Figura 10**), a partir del día 31, se observa una marcada diferencia entre las respuestas inmunes de los tres diferentes grupos. Los animales del grupo vacunado con MVs tuvieron mayores niveles de IgA, en comparación a los corderos de los otros dos grupos.

Figura 10. Evaluación y comparación de los títulos de anticuerpos mediante ELISA INDIRECTA de IgA de los 3 grupos experimentales.



*1° Inmunización (Día 29)

** 2° Inmunización (Día 36) solo con MVs

Periodo de adaptación (Día 1 al 28)

IX.2. Ganancia diaria de peso.

TABLA 2. Promedio de ganancia diaria y total de peso de los 3 diferentes grupos de corderos evaluados.

Grupo	N	Peso al nacimiento (kg)	Peso al destete (kg) 60 días	Ganancia total de peso (kg)	Ganancia diaria de peso (g)
MVs	20	2.7	17.8	15.1	251
Vacuna comercial	20	2.5	14.9	12.3	206
Control	20	3.4	18.5	14.9	249

TABLA 3. Análisis de varianza

	Microvesículas	Vacuna comercial	Testigo
Peso al nacimiento (kg)	2.7b	2.5b	3.4a
Peso al destete (kg)	17.8a	14.9b	18.5a
Ganancia diaria de peso (g)	251a	206a	249a
Ganancia total de peso (kg)	15.1a	12.3b	14.9a

Letras diferentes en las filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

VIII. DISCUSIÓN.

Desde principios de los años 90's en México se encuentran disponibles las vacunas contra la Manhemiosis bovina, estas vacunas son básicamente bacterinas elaboradas principalmente con células completas de *M. haemolytica* serotipo A1, ya que dicha enfermedad en el ganado bovino se asocia exclusivamente a este serotipo, las cuales se han utilizado de forma indistinta en ovinos. Sin embargo, el serotipo que principalmente asociado al desarrollo de la enfermedad en ovinos es el serotipo A2.

Adicionalmente la ineficiencia de los biológicos que se elaboran a base de células bacterianas completas, los cuales producen exclusivamente anticuerpos séricos contra antígenos capsulares. No obstante, se conoce la existencia de otros antígenos de *M. haemolytica* altamente antigénicos que no están contenidos en la formulación de las bacterinas, como lo son la LKT, LPS, PME; entre otros, (Donachie, 1997). Es por ello la importancia de obtener un inmunógeno eficaz para la prevención y control de la enfermedad en nuestro país.

Se sabe que el éxito de la vacunación requiere que la respuesta inmune este dirigida a los factores o antígenos de la bacteria que estén relacionados con la protección, aunado a esto, es de utilidad examinar el estado inmune de los animales en campo, sin dejar de considerar factores externos que comprometan la respuesta inmune del animal. La inmunización contra la Mannhemiosis neumonica ovina se ha intentado durante décadas y su protección ha sido limitada, debido principalmente a que las vacunas empleadas confieren escasa protección e incluso pueden llegar a incrementar el daño pulmonar (Confer *et. al.*, 1995; Confer *et. al.*, 1986; Confer *et. al.*, 1985). Por otro lado, la mayoría de estos biológicos, contienen el serotipo A1, el cual afecta principalmente a bovinos y los productores en México adecúan las dosis para ovinos, haciendo así aún más ineficiente la protección.

En el presente trabajo, se evaluó mediante ELISA Indirecto (Srinand *et. al.*, 1995) una vacuna a base de MVs de *M. haemolytica* serotipo A2, administrada por vía intranasal (IN) a un rebaño de corderos en condiciones de campo. Dicho biológico con **título de patente No. 341611**, se comparó con una bacterina - toxoide comercial elaborada para aplicación en bovinos y contiene células completas de *M. haemolytica*

serotipo A1, rica en leucotoxina, la cual es utilizada como inmunógeno en la práctica de sanidad en ovinos a nivel de campo en México.

El interés de las MVs y su uso como biológico vacunal ha ido en aumento a medida que la investigación de estas ha revelado las complejidades moleculares de la vesiculación en las bacterias y como dichas estructuras pueden ser adaptadas para combatir agentes bacterianos infecciosos (Collins, 2011). Estas estructuras han sido explotadas con fines vacunales, ya que tienen propiedades inmunogénicas que inducen respuesta protectora de anticuerpos bactericidas de mucosa y sistémicos (Fering *et. al.*, 2006; O'Hallahan *et. al.*, 2004; Oster *et. al.*, 2005; Oster *et. al.*, 2007; Jackson *et. al.*, 2009; Ellis *et. al.*, 2010).

La composición de las MVs bacterianas, las hace significativas activadoras de la respuesta inmune innata y adquirida. Las vacunas elaboradas a base de estas estructuras se caracterizan porque durante su proceso de formación, arrastran constitutivamente varios antígenos que desencadenan una respuesta inmune específica (Srinand *et. Al.*, 1995; O'Hagan *et. Al.*, 2004; Dey *et. Al.*, 2011), así como, antígenos en tránsito y fragmentos de ADN, siendo los primeros ya mencionados los que potencializan el efecto antigénico e inmunológico (González, 2007).

La caracterización de las MVs de *M. haemolytica* A2, se realizó en un trabajo previo (González, 2007). Ahora se sabe, que dichas estructuras acarrean una gran cantidad de antígenos, que juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, así como de la respuesta inmune que activan, entre los cuales se encuentran la PME, consideradas importantes antígenos estructurales, de las cuales destacan las proteínas 45, 54 y 60 kDa, LPS (120 kDa), LKT(104 kDa) y un fragmento de ADN (23 Kpb), los cuales son componentes biológicamente activos que se sinergizan entre sí, para potencializar la respuesta inmune contra la bacteria completa (González, 2007; Avalos, 2011; Riquelme, 2011).

Se sabe que la secreción de MVs en las bacterias Gram negativas, es utilizada para transportar y liberar factores de virulencia, estas estructuras contienen adhesinas,

toxinas y componentes que actúan directamente en la adherencia y la invasión causando citotoxicidad y promoviendo inflamación (González, 2007).

El biológico, fue previamente evaluado en condiciones experimentalmente controladas, en un rebaño de corderos de 3 meses de edad. En ese trabajo se obtuvo una adecuada respuesta inmune humoral en un 100% de los corderos que fueron vacunados con las MVs por vía intranasal (González *et. al.*, 2011; González *et. al.*, 2007), evitando el desarrollo de lesiones neumónicas típicas de la Mannheimiosis Ovina, al ser desafiados con una cepa de campo patógena de *M. haemolytica* A2.

M. haemolytica serotipo A2, es saprofita-comensal de las vías respiratorias superiores, en esta condición, los patógenos pueden liberar MVs que les permiten establecer cierta competencia con el resto de la microbiota nasal, para constituir así sus propios nichos (González *et. al.*, 2007). Las MVs, también son un medio que transfiere material genético entre las bacterias comensales y de esta manera contribuyen a la diversidad y supervivencia bacteriana. Las MVs de *P. aeruginosa* son capaces de transferir resistencia a antibióticos a otras bacterias (Cioful *et. al.*, 2010), mejorando así la supervivencia de las bacterias vecinas comensales. En esta condición, no se descarta la posibilidad de que las MVs de *M. haemolytica*, interactúen con el sistema inmune innato generando una respuesta adquirida.

Por lo tanto, las MVs podrían jugar un papel relevante tanto en el establecimiento como en el desarrollo de una infección bacteriana en el huésped. Esto explica, porqué en los corderos de este estudio, así como los animales de experimentos previamente evaluados, se demostró la presencia constante de anticuerpos contra la bacteria, previo a la inmunización. En este caso en particular, no podemos descartar que la alta concentración de inmunoglobulinas observada durante el periodo de aclimatación, pudiera estar determinada a la presencia de anticuerpos maternos. Como se mencionó anteriormente, las hembras son vacunadas antes del invierno y comienzan a parir durante este periodo.

Parte del manejo sanitario de los corderos en cuestión, es asegurarse que todos consuman calostro durante las primeras horas de vida. Resultando esto, en altas concentraciones de IgG e IgM previa inmunización (Figura 8 y 9). El calostro es una

fuente de inmunidad pasiva adquirida a partir de la transferencia de anticuerpos maternos por medio de la lactancia (McQuoid *et. al.*, 1995).

El presente trabajo se realizó en condiciones de campo, circunstancias que favorecen el estado de inmunosupresión de los animales por las múltiples actividades de manejo, que conllevan a la susceptibilidad de la infección. El trabajo experimental se inició, a los 21 días de edad de los corderos, cabe señalar que las camadas se homogenizaron en aquellos casos en los que la madre murió, o bien en cuanto a partos múltiples, esto según la fecha de nacimiento, sin hacer distinción de raza y sexo. De esta forma los grupos quedaron conformados por animales que nacieron el mismo día o bien, en la misma semana.

La concentración basal de anticuerpos contra la bacteria, se estableció de acuerdo al calendario de inmunización del día 1 al día 28, que incluyeron 4 muestreos de sangre para la obtención de suero. El primer día de inmunización comenzó al día 29 del calendario. En este periodo, de tiempo los animales fueron sometidos a descole y desparasitación (ivermectina inyectable a dosis de 0.2mg/kg peso corporal, vía SC). Esta condición de manejo, pudo haber favorecido el estado de inmunosupresión que a su vez contribuyó a la posible reactivación de cepas comensales entre los corderos y la detonación de la respuesta inmune humoral, resultando en altos títulos de anticuerpos de tipo IgG, como se muestra en la **Figura 9**. Por otra parte se desconoce la prevalencia de agentes virales respiratorios en la zona que pudieran estar asociados al proceso. Sin embargo, se vacunó en la explotación contra Adenovirus y Parainfluenza.

Las diferentes inmunoglobulinas evaluadas en este trabajo fueron IgA, IgG e IgM, en donde la IgG, fue predominante en la respuesta secundaria, estas inmunoglobulinas son capaces de atravesar el endotelio vascular para acceder más fácilmente a focos inflamatorios (Collado *et. al.*, 2008).

Las IgG secretoras predominan como anticuerpo primario en el tracto respiratorio inferior del ganado, estas son reconocidas por los macrófagos tisulares bajo el proceso de opsonización, haciendo así más eficiente la eliminación del agente. Esta

última actividad es de gran interés en el desarrollo de lesiones neumónicas (Vitela *et. al.*, 1993).

Los animales que se encuentran con altas concentraciones de IgG en suero, desarrollan lesiones más severas durante la infección, debido a que ésta contribuye significativamente al daño pulmonar al atravesar la pared alveolar. La administración parenteral de inmunógenos, induce la producción de IgG en suero con su consecuente migración al pulmón. En el momento de la infección, las IgG rápidamente opsonizan a las bacterias en el pulmón, favoreciendo su eliminación por medio del complemento y de la activación de los macrófagos alveolares. Sin embargo, *M. haemolytica* tiene una potente LKT, que mata a los macrófagos alveolares y promueven el daño continuo en el pulmón, así como la destrucción de IgG mediante proteasas de secreción que elimina las bacterias durante su colonización en el pulmón. *M. haemolytica* en el pulmón disminuye la fagocitosis eficiente de los macrófagos alveolares, reduciendo así, el aclaramiento pulmonar (Vitela *et. al.*, 1993).

Los anticuerpos de tipo IgM son las inmunoglobulinas que rápidamente se forman en respuesta a un estímulo antigénico (Respuesta primaria), esta inmunoglobulina se caracteriza por poseer una capacidad neutralizante, precipitante, aglutinante que fija al complemento y activa la respuesta inmune. Sin embargo, no atraviesa activamente las membranas biológicas, esta última propiedad hace que esta inmunoglobulina ejerza su acción, normalmente en los espacios intravasculares, donde representa del 5 al 10% de las inmunoglobulinas séricas totales y junto a la IgD es la más abundante en la superficie de los linfocitos B como receptor de membrana, estas últimas de poca relevancia en animales (Frias *et. al.*, 2007).

En condiciones de campo, la patogenia de la Mannheimiosis neumónica indica que el hospedador se somete a factores predisponentes que inducen inmunosupresión como son las situaciones de estrés (Destete, decole, descorné y manejo en general), asociadas a infecciones virales primarias (Principalmente por P13) que favorecen que *M. haemolytica* proliferen, beneficiando así su colonización a zonas más profundas del árbol bronquial e invadiendo rápidamente el parénquima pulmonar lo cual desencadena el cuadro neumónico característico del proceso. De esta manera, la bacteria es eliminada

por secreciones nasales en forma de aerosoles diseminando así la enfermedad en el rebaño (Briggs *et. al.*, 1992; Jericho *et. al.*, 1986).

Los resultados que se obtuvieron de este trabajo sugieren que la vacunación de MVs por la vía IN, induce una respuesta local efectiva de IgA. Los animales del grupo A (vacunados con MVs por vía IN) desarrollaron una alta concentración de éstas inmunoglobulinas (0.358-0.087). En la **Figura 10**, en donde se puede observar el comportamiento de estos anticuerpos. La respuesta de IgA se da inmediatamente después de la primera vacunación, con lo cual se observó una respuesta mayor en comparación con el grupo B donde se aplicó vacuna comercial vía IM (0.199-0.106) y por el grupo C animales vacunados con SSF por vía IN e IM (0.171- 0.052), en los cuales las respuesta no fue significativa.

Los animales del grupo A, a partir del día 31 del experimento, elevaron la concentración de anticuerpos IgA, resultando esto, en la mayor respuesta al día 38 del mismo. A partir de ahí la concentración de anticuerpos en este grupo se mantuvo constante hasta el final del experimento. Esto se debe a que se realizó una segunda inmunización, con la cual se induce un efecto booster. El efecto booster es una respuesta rápida e intensa del sistema inmune a una segunda o posterior dosis de antígeno (componente esencial de una vacuna), que se aplica para lograr una mayor cantidad de anticuerpos que con la dosis inicial. Con la primera dosis se "despierta" la inmunidad del individuo frente al organismo contra el que se está vacunando y la segunda dosis refuerza esa alerta, en donde el sistema inmune reacciona de forma mucho más intensa, quedando el individuo realmente protegido. El esquema de vacunación de MVs de *M. haemolytica* A2, propone 2 dosis de aplicación, con la finalidad de generar una protección completa y eficaz.

Por otro lado, se decidió comparar el biológico de MVs, con la bacterina toxoide y esquema respectivo de vacunación, con la finalidad de analizar las dosis y biológicos que utilizan normalmente los productores de ovinos. Cabe mencionar que el biológico comercial, es una bacterina toxoide contra los principales clostridios y bacterina con leucotoxoide contra *Mannheimia haemolytica* A1. Esta se utiliza para la prevención y control de enfermedades que causan muerte súbita asociadas a los siguientes antígenos: *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum*, *Cl. haemolyticum*, *Cl. novyi*, *Cl. sordelli*, *Cl. perfringens*

tipo C y D y sus toxoides, adicionalmente, *Pasteurella haemolytica* (ahora reclasificada como *Mannheimia haemolytica*) con su leucotoxide y un adyuvante hidrosoluble especial, de aplicación en bovinos, por lo que los productores adecuan en los ovinos, las dosis y respectivos calendarios.

La inmunoglobulina A (IgA), es la clase predominante de anticuerpo en las secreciones del organismo como lo es la saliva, lágrimas, calostro, leche así como secreciones respiratorias gastrointestinales y genitourinarias. En sangre se encuentra como una molécula monomérica, pero en las mucosas se encuentra en forma dimerica (IgA secretora). Actúan en la defensa inicial contra los patógenos invasores (virus y bacterias) antes de que penetren en el plasma e identifican los antígenos patógenos impidiendo que se instalen en las mucosas (Devlin, 2004).

Los animales del grupo A, paralelamente desarrollaron una alza en las concentraciones de anticuerpos IgG (0.77 ± 0.13 D.S), con respecto al grupo B (0.64 ± 0.23 D.S) y al grupo C (0.56 ± 0.27). Los animales del grupo A, también desarrollaron una mayor concentración de anticuerpos IgM (0.53 ± 0.10 D.S) con respecto a los animales del grupo B (0.40 ± 0.17 D.S) y del grupo C (0.33 ± 0.16 D.S).

Esto se explica debido a la forma en que el antígeno fue internalizado y liberado en el organismo, lo cual es un factor clave para generar una respuesta inmune adquirida mucho más eficiente tanto a nivel local, como a nivel sistémico. Una vez que el antígeno se asocia a un sistema nanoparticulado, que en este trabajo se utilizó como adyuvante, permitiendo así aumentar su internalización paulatina y posterior liberación. De esta manera se favorece, que el antígeno sea procesado y presentado adecuadamente al sistema inmune, generando una respuesta mucho más eficiente. Otro factor que interviene en este tipo de respuesta, es la modulación del tamaño de la partícula antigénica, la cual reconocen rápidamente las células presentadora de antígeno (Célula dendríticas o macrófago tisular) que acceden directamente a los linfonodos en lugar de ser captadas previamente por las células dendríticas periféricas, para su posterior procesamiento. De este modo, la respuesta inmune se genera directamente en los órganos inductores (linfoides) (Banchereau *et. al.*, 1998).

Esto sustenta lo observado en los niveles de anticuerpos del tipo IgA, IgG e IgM, que fueron mayores en el grupo de los animales vacunados con MVs de *M. haemolytica* A2, en comparación con los otros 2 grupos de animales evaluados (Banchereau *et. al.*, 1998).

En el caso de los adyuvantes que funcionan como un sistema de liberación antigénica, es especialmente interesante la capacidad de las nano partículas poliméricas (adyuvante + antígeno) para ser más eficazmente captadas e internalizadas por las células dendríticas debido a su tamaño nanométrico. El que una nanopartícula polimérica se internalice de una u otra manera, depende de forma importante de su tamaño, carga y composición superficial (Kovacsovics *et. al.*, 1995).

El interés en los últimos años por la vacunación a través de las mucosas se ha incrementado debido a la posibilidad de generar una respuesta inmune específica a nivel de las superficies de las mismas. Esta característica es de especial interés, debido a la gran ventaja que ofrece ante la inmunización parenteral a la hora de generar protección eficiente, frente a patógenos que accedan al organismo utilizando esta vía de entrada. Las superficies mucosas son altamente ricas en tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT), además de contar con la importante presencia de células presentadoras de antígenos (CPA) en la zona de la submucosa. De esta forma cualquier antígeno liberado y captado por las CPA del MALT y la submucosa, será capaz de iniciar una respuesta inmune específica a nivel local, mediante la secreción de IgA, así como a nivel sistémico con la presencia de IgG en sangre (Neutra *et. al.*, 2006).

Algunas de las ventajas de la vacunación por la vía IN, es la inducción de la respuesta inmune local de IgA, estos anticuerpos actúan como barrera contra la invasión aérea de microorganismos patógenos. En el caso de *M. haemolytica*, la IgA neutraliza su proliferación cuando ésta, sale de su estado saprofito-comensal o bien ingresa al sistema como cepa patógena. Los anticuerpos de este tipo también poseen un efecto antiinflamatorio, ya que no activan al sistema del complemento e inhiben la quimiotaxis de los neutrófilos. Además la inoculación vía IN conduce a una respuesta sistémica que aumenta el efecto protector en la mucosa inmunizada (González, 2012).

Las vacunas mucosales pueden tener varias ventajas significativas por encima de las vacunas parenterales, entre las que se pueden incluir su fácil administración y la inducción de inmunidad local en el punto natural de entrada del patógeno (González, 2012).

El hecho de inmunizar mediante la vía parenteral (IM y SC), tiene diferentes desventajas en comparación a la aplicación de vacunas por vía mucosal. Algunas de ellas son, que se genera un aumento de riesgo en la transmisión iatrogénica de patógenos, los cuales se transfieren a través de fluidos biológicos. Es especialmente significativo en países en vías de desarrollo, el uso no seguro del material de inmunización (agujas y jeringas) debido principalmente a su reutilización y al manejo en condiciones no estériles de los viales multidosis conteniendo la vacuna. Este es un importante foco de contagio de enfermedades transmitidas a través de fluidos biológicos, dando lugar a un aumento de casos de transmisión de enfermedades, tanto en los pacientes como en el personal sanitario que lo aplica, durante el proceso de inmunización. Por otro lado, se generan residuos peligrosos derivados del uso de las agujas y jeringas para la administración que no siempre son adecuadamente tratados y eliminados (Clements *et. al.*, 2004).

Es por ello que se vuelve muy interesante el desarrollo de nuevas tecnologías mediante el diseño de sistemas de liberación de vacunas sin agujas para mejorar la seguridad durante la inmunización, disminuir la problemática derivada de los desechos asociados, al mismo tiempo que se mejoraría por parte de los animales y se reducirían los costos ligados a la vacunación, al utilizar tecnologías y modos de administración más sencillos (Clements *et. al.*, 2004).

En la evaluación experimental de las vacunas a base de MVs de diversas especies bacterianas, se han obtenido resultados alentadores con respecto a la vía de inoculación. En el caso de las MVs de *Borrelia burgdorferi*, estas se inocularon en conejos por vía intradérmica, resultando esto en la secreción de anticuerpos neutralizantes principalmente IgG, IgM e IgA, contra dos antígenos dominantes, responsables de la adherencia y la colonización bacteriana. Por otro lado, la inmunización con MVs de *Vibrio cólera* a ratones y conejos por diferentes vías de administración, (IN, intragástrica e intraperitoneal), suscito en todos los casos, una

protección a largo plazo con la consecuente producción de IgA e IgE, anticuerpos dirigidos principalmente contra el LPS de dicha bacteria (Collins, 2011).

Las vacunas basadas en MVs de diferentes cepas y antígenos específicos del meningococo B, han brindado protección única y eficaz, a través de la inducción de anticuerpos de mucosa y sistémicos. El interés por las vacunas basadas en MVs se ha difundido a otros agentes bacterianos infecciosos, en estos se incluyen: *S. typhimurium*, *B. burgdorferi*, *B. pertussis*, *Y. pestis*, *P. aeruginosa* y *B. melitensis* (Collins, 2011).

Bjune *et. al.*, 1991, utilizó una vacuna desarrollada en Noruega, a base de MVs en contra de la enfermedad meningocócica en un ensayo clínico, el cual se componía por la administración de dos dosis por vía IM, cada una con 6 semanas de diferencia. Dicho estudio mostró una eficiencia de 57% de protección durante 29 meses de vigilancia. Se observó que la respuesta inmune, disminuía notablemente durante este periodo de vigilancia y procedió a aplicar una tercera dosis. Estos estudios demostraron tener una respuesta de anticuerpos más prolongada. Con base en a la experiencia de Bjune *et. al.*, 1991, Haneberg *et. al.*, 1998, pretendió profundizar en el uso de esta vacuna contra la enfermedad meningocócica, pero con la diferencia de su aplicación por vía IN. En contraste con la inmunización IM, la aplicación por la vía IN, mostró una producción elevada de IgA en mucosa contra la cepa vacunal, mientras que la respuesta de IgG en suero (evaluado por el método de ELISA I.) fue notablemente más baja en comparación con la aplicación IM. La actividad bacteriana en suero (SBA) de algunos de los vacunados por la vía IN mostró títulos comparables con los de aplicación IM (Collins, 2011).

Por otro lado, en un trabajo previo que realizó Loste *et. al.*, 2002, en el cual se trataban dos distintos grupos que se componían de 20 corderos cada uno. El primer grupo se trató con una vacuna a base de leucotoxina de *P. haemolytica* A1, que inició con una media de peso de 8.3 kg y el segundo grupo fue un grupo control que no recibió ningún tratamiento y con una media de peso inicial de 8.6 kg. En el experimento realizado por Loste, ningún animal del grupo vacunado presentó signos de enfermedad, mientras que en el grupo control, 3 de los animales recibieron tratamiento por presentar signos neumónicos. Se observó que la ganancia diaria de peso de los corderos del grupo vacunado fue mayor que la de los corderos del grupo control. Así, el promedio de peso

del grupo vacunado a los 62 días fue de 23.05 kg, mientras que el peso del grupo control fue de 20.45 kg, obteniendo una mayor ganancia de peso los animales del grupo vacunado durante el experimento.

En el presente trabajo los resultados obtenidos sobre la ganancia de peso en los animales de los diferentes grupos (Tabla 3), solo se observó, que los animales vacunados con las MVs obtuvieron una mejor ganancia de peso hasta el momento del destete (15.1 kg), con respecto al grupo testigo.

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos sugieren que los animales del grupo A (vacunado con MVs), obtuvieron una mejor respuesta inmune, al alcanzar altos títulos de anticuerpos (IgA e IgG- 0,358; 0,769) proponiendo que se puede dar una mejor protección contra la enfermedad. Lo mencionado anteriormente se ve reflejado en este grupo de animales, ya que obtuvieron la mejor ganancia de peso al destete con respecto a los otros dos grupos evaluados.

Por otro lado, cabe mencionar que dos animales del grupo control, así como un cordero del grupo de vacunados con vacuna comercial, enfermaron y murieron con cuadro neumónico importante. Los resultados de este hecho, no se muestran en este trabajo.

Demostrando así que el desarrollo de la vacuna a base de MVs de *M. haemolytica* con sugiere que puede darse una protección necesaria para evitar la aparición enfermedad, lo que abraja así un camino importante sobre la investigación a fondo de estas estructuras, que dará lugar a la comercialización de un biológico específico para la Mannheimiosis Ovina y con ello disminuir la incidencia y la severidad de la enfermedad en nuestro país.

XI CONCLUSIONES.

-La respuesta inmune local de IgA encontrada en este trabajo muestra una mayor respuesta en comparación a la obtenida con la vacuna comercial administrada.

-La respuesta inmune sistémica de IgG e IgM, encontrada en este trabajo mostraron una mayor respuesta en comparación a la obtenida con la vacuna comercial

-La vacunación por vía IN con MVs de *M. haemolytica* A2, confieren una adecuada respuesta inmune local y sistémica en ovinos.

-La ganancia de peso en relación a la vacunación en los diferentes grupos evaluados, mostro poca relevancia.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Alaniz R. C., Deatherage B. L., Lara J. C. and Cookson B. T. 2007. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J. Immunol.* 179:7692–7701.

Al-Ghamdi G. M., Ames T. R., Baker J. C., Walker R., Chase C. C., Frank G. H., et al. 2000. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest.* 12:576-578.

Allen J. W., Viel L., Bateman K. G., Rosendal S., Shewen P. E., Physick S. P. 1991. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can J Vet Res.* 55:341-346.

Angen O., Ahrens P., Bisgaard M. 2002. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microbiol.* 84:103-114.

Angen O., Mutters R., Caugant D. A., Olsen J. E., Bisgaard M. 1999. Taxonomic relationship of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16 s rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen.nov, *Mannheimia granulomatis* comb.nov; *Mannheimia glucosida* sp. Nov; *Mannheimia ruminalis* sp. Nov. and *Mannheimia varigena* sp. Nov; *Int. J. Syst. Bacteriol.*

Angen O., Quirie M., Donachie W., Bisgaard M. 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol.* 65:283290.

Aoki M., Kondo M., Nakatsuka Y., Kawai K. and Oshima S. 2007. Stationary phase culture supernatant containing membrane vesicles induced immunity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Vaccine* 25:561–569.

Avalos G. C. 2011. Evaluación Estructural del Tejido Pulmonar, Linfocitos Tisulares y Macrófagos Alveolares de Ovino en Presencia de Microvesículas (MVs) de *Mannheimia Haemolytica* A2. Tesis de Licenciatura, FESC. UNAM.

Balayut C. S., Simonson R. R., Bemrick J., Maheswaran S. K. 1981. Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1920-1926.

Banchereau J. and Steinman R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392(6673): 245-252.

Baraibar J. B. 2006. Algunos conceptos sobre vacunas bacterianas y virales. *Vet. Montevideo*, 41:35 – 42.

Beveridge T. J. 1999. The ultrastructure of Gram-positive cell walls, p. 3–10. In V. Fischetti, R. Novick, J. Ferretti, D. Portnoy and J. Rood (ed.), *Grampositive pathogens*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Beveridge T. J. and Graham L. L. 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* 55:684–705.

Beveridge T. 1999. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181 (16): 4725–4733.

Bhadki S., Martin E. 1991. Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* 59: 2955-2962.

Bhadki S., Mackman N., Gray L., Holland I. B. 1986. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pore. *Infect. Immun.* 52: 6369.

Blanco V. F., Trigo F., Jaramillo M. L., Aguilar R. F. 1995. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Rev Lat-Am Microbiol.* 37:121-126.

Blander J. M. and Medzhitov R. 2006. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*. 440:808–812.

Biberstein E. 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica* In: BAN JR, editor. *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press Inc. 253-269.

Boehm D. F., Welch R. A., Snyder I. S. 1990. Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* 58: 1957-1964.

Boyce J., Lo R., Wilkie I., Adler B., Giles C. L., Prescott J. F., Songer J. G., Thoen C.O. 2004. *Pasteurella* and *mannheimia* In: *Pathogenesis of bacterial infectious in animals*. Carlton, Australia: Blackwell publishing; 273-294.

- Bowersock T. L., Hogenesch H., Suckow M., Guimond P., Martin S., Borie D. et al. 1999. Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres. *Vaccine*. 17:1804-1811.
- Bowland S. L., Shewen P. E. 2000. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J*. 41:33-48.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. *Anal Biochemistry*. 72:248-254.
- Breider M. A., Kumar S., Corstvet R. E. 1990. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. *Infect. Immun*. 58: 1671-1677.
- Breider M. A., Kumar S., Corstvet R. E. 1991. Interaction of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated damage to pulmonary endothelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 27: 337-350.
- Briggs R. E., Frank G. H. 1992. Increased elastase activity in nasal mucus associated with nasal colonization by *Pasteurella haemolytica* in infectious bovine rhinotracheitis virus-infected calves. *Am. J. Vet. Res*. 53:631-635.
- Brogden K. A., DeBey B., Cutlip R. 1995. Lesions induced in vivo by cell associated products of *Pasteurella haemolytica* and their role in the pathogenesis of bovine respiratory disease. *Memorias del Seminario de Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino*. Monterrey, N.L. México, D.F., 23-29. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México.
- Burrows L. L., Olah W. E., Lo R.Y. 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect Immun*. 61:50015007.
- Carter G. R. 1967. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. *Adv Vet Sci*. 11:321-379.
- Casella A. 2005. Neumonía, Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB). Informe Técnico 1 y 2, Elanco, Bs. As.
- Caverly M. J. 2003, Diamond G., Gallup M. J., Brogden A. K., Dixon A. R. and Ackerman R. M. Coordinated Expression of Trácela Antimicrobial Peptide and Inflammatory-Response Elements in the Luna of Neonatal Calves with Acute Bacterial Pneumonia. 71, (5): 2950-2955.

- Chang Y. F., Young D. R. Y., Post D., Struck K. D. 1987. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Immun.* 55: 2348-2354.
- Chaslus D. E., Lesage D. M. C., Leroy S. S., Martel J. L., Coudert P., Lafont J. P. 1996. Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. *Vet Microbiol.* 52:91-102.
- Cioful O., Mandsberg L. F., Bjarnsholt T., Wassermann T., Høiby N. 2010. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants *J. Microbiology*, 156. 1108-1119.
- Clements C. J., Larsen G. and Jodar L. 2004. Technologies that make administration of vaccines safer. *Vaccine.* 22: 2054-2058.
- Clinkenbeard K. D., Moiser D. A., Confer A. W. 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Immun.* 57: 420-425.
- Colín F., Jaramillo L., Aguilar F., Trigo F., Merino M. 1987. Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev Lati-Am Microbiol.* 29:231-234.
- Collado M. V., Porrás R., Cutuli M. T., Gómez L. E. 2008. El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2(1): 1-16.
- Collins B. S. 2011. Gram-negative Outer Membrane Vesicles in Vaccine Development. *Discovery Medicine.* 62: 7-15.
- Collins M., Swanson E. 1981. Use of the API 20E system to identify nonenterobacteriaceae from veterinary medical sources. *Am J Vet Res.* 42:1269-1273.
- Confer A. W., Panciera R. J., Gentry M. J. and Fulton R. W. 1986. Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 47:1853.

Confer A. W., Panciera R. J., Mosier D. A. 1985. Immunity to *Pasteurella haemolytica*. JAVMA. 193:1308-1316.

Confer A. W., Panciera R. J., Fulton R. W., Gentry M. J., Rummage J. A. 1985. Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica* on resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Am J Vet Res. 46:342-347.

Conlon J., Shewen P., Lo R. Y. 1991. Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. Infect Immun. 59:587-591.

Contreras J. A. 2005. Complejo respiratorio bovino. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Manual de Ganadería Doble Propósito.

Curtis III. R. 2002. Bacterial infectious disease control by vaccine development. J Clin Invest 110:1061-1066.

Derosa D. C., Mechor G. D., Staats J. J., Chengappa M. M., Shryock T. R. 2000. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. J Clin Microbiol. 38:327-332.

Deshpande M. S., Ambagala T. C., Ambagala A. P., Kehrl M. E. J. R., Srikumaran S. 2002. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate Mannheimia (*Pasteurella*) haemolytica leukotoxin-induced cytolysis. Infect Immun. 70:5058-5064.

Devlin T. M. 2004. Bioquímica 4ª edición. Reverté, Barcelona ISBN 84-291-7208-4.

Dey A. K., Srivastava I. K. 2011. Novel adjuvants and delivery systems for enhancing immune responses induced by immunogens. Expert Rev Vaccines 10:227-251.

Donachie W. 1997. Vaccines against *Pasteurella*. World Association of Microbiologists Immunologists and Specialists in Infection Disease. 14th International Symposium, Edinburgh. Annual Scientific Report.

Durand V., Mackenzie J., de Leon J., Mesa C., Quesniaux V., Montoya M., Le Bon A. and Wong S. Y. 2009. Role of lipopolysaccharide in the induction of type I interferon dependent cross-priming and IL-10 production in mice by meningococcal outer membrane vesicles. Vaccine. 27:1912–1922.

Ellis T. N., Leiman S. A., Kuehn M. J. 2010. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect Immun.* 78:3822-3831.

Emert L., Rousseau S., Schutte H., Birkemeyer R. G., Grimminger F., Bhakdi S., Duncker H. R. and Seeger W. 1992. Induction of severe vascular leakage by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rabbit lungs. *Lab. Invest.* 66: 362-369.

Erasmus J. 1983. The usefulness of the API 20E classification system in the identification of *Actinobacillus actinomycetem comitans*, *Actinobacillus seminis* and *Pasteurella haemolytica*. *Onderst J Vet Res.* 50: 97-99.

Espada C., Pinto C., Cid M. 2010. Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.*

Ewers C., Lubke-Becker A., Wieler L. H. 2004. *Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 117:97-115.

Fedorova N. D., Highlander S. K. 1997. Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect Immun.* 65:2593-2598.

Feiring B., Fuglesang J., Oster P., Naess L. M., Helland O.S., Tilman S., Rosenqvist E., Bergsaker M.A., Nokleby H., Aaberge I. S. 2006. Persisting immune responses indicating long-term protection after booster dose with meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 13:790-796.

Fenwick B. W. 1990. Virulence attributes of the lipopolysaccharides of the HAP group organisms. *Can. J. Vet. Res.* 54: 528-532.

Fransen F., Boog C. J., Van Putten J. P. and Van der Ley P. 2007. Agonists of Toll-like receptors 3, 4, 7, and 9 are candidates for use as adjuvants in an outer membrane vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Infect. Immun.* 75:5939–5946.

Frasch C. E. 1990. Production and control of *Neisseria meningitidis* vaccines. *Adv. Biotechnol. Processes.* 13:123–145.

Frías M., Molina I. J., Castro L. y Peña J. 2007. *Inmunoglobulinas*. Bellaterra Ediciones.

Gerbic D. G., Walker R. D., Baker J. S., Moore R. N. 1989. Calcium ion involvement in the action of *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Vet. Microbiol.* 19: 325-335.

Giesbrecht P., Kersten T., Maidhof H. and Werke J. 1998. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1371–1414.

Gilmour N. J., Donachie W., Sutherland A. D., Gilmour J. S., Jones G. E and Quirie M. 1991. Vaccine containing iron-regulated proteins of *Pasteurella haemolytica* A2 enhances protection against experimental pasteurellosis in lambs. *Vaccine.* 9:137-140.

Gioia J., Qin X., Jiang H., Clinkenbeard K., Lo R., Liu Y., et al. 2006. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, and Pasteurellaceae phylogeny. *J Bacteriol.* 188:7257- 7266.

González G. 2007. Comprendiendo la neumonía bovina producida por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. No. 11, pp 13

González J. M. 2008. Síndrome respiratorio ovino: importancia, diagnóstico, factores predisponentes, agentes etiológicos y prevención mediante la vacunación. Jornada Satélite SEOC.

Gonzalez R. C., De la Garza A. M. G., Tenorio G. V., Suárez G. F., Trigo T. F. 2011. Título de la invención: Biológico vacunal elaborado a partir de microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 de administración intranasal en ovinos) Número de Patente: MX/a/2011/011868.

González R. C., De la Garza M., Suárez G. F., Trigo T. F., Vega L. M. A., Tenorio G. V. 2012. Intranasal immunization with a vaccine based in outer-membrane microvesicles of *Mannheimia haemolytica* serotype A2, prevents the development of pneumonia after the experimental challenge of lambs.

González R. C., Tenorio G. V., De la Garza A. M. G., Trigo T. F. 2007. Evaluación y caracterización de microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 para su posible utilización como vacuna en ovinos. Tesis de Doctorado; UNAM. FES Cuautitlán.

González R. C., Tenorio G. V., Trigo T. F., Reyes L. M., León S. N., Godínez V. D., De la Garza A. M. 2007. Characterization of Microvesicles of *Mannheimia haemolytica* Serotype A1 (Reference Strain) and Serotype A2 (Field Isolate). *Anim and Vet Adv.* 6 (10): 1172-1182.

Hernández, M. A., Alvarado N. A. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. Rev. Biomed 12:272-280.

Higgins M. L. and Shockman G. D. 1976. Study of a cycle of cell Wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstruction of thin sections of the cell. J. Bacteriol. 137:1346–1358.

Highlander S. K., Fedorova N. D., Dusek D. M., Panciera R., Alvarez L. E., Rinehart C. 2000. Inactivation of *Pasteurella* (*Mannheimia*) *haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. Infect Immun. 68:3916-3922.

Highlander S. K. 2001. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. Front Biosci. 6:1128-1150.

Himmel M. E., Yates M. D., Lauerman L. H., Squire P.G. 1982. Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 43: 764-767.

Holst J., Martin D., Arnold R., Huergo C. C., Oster P., O'Hallahan J. and Rosenqvist E. 2009. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. Vaccine.27 (Suppl. 2):B3–B12.

Iovane G., Galdiero M., Vietello M., De Martino L. 1998. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins of bovine neutrophils. FEMS, Immunol. Med. Microbiol. 1: 29-36.

Jackson C, Lennon D. R., Sotutu V. T., Yan J., Stewart J. M., Reid S., Crengle S., Oster P., Ypma E., Aaberge I., Mulholland K., Martin D. R. 2009. Phase II meningococcal B vesicle vaccine trial in New Zealand infants. Arch Dis Child 94:745-751.

Jaramillo A. C., Hernández C. R., Suarez G. F., Martínez M. J., Aguilar R. F., Jaramillo M. L., et al. 2007. Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico. J Anim Vet Adv. 6:404- 409.

Jaramillo A. C., Hernández C. R., Suarez G. F., Martínez M. J., Aguilar R. F., Jaramillo M. L., et al. 2008. Characterization of *Mannheimia spp.* strains isolated

from bovine nasal exudates and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. Res Vet Sci; 84:7-13

Jaramillo C. J., Trigo. F., Suárez, F. 2009. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. Vet. M'x. 40 (3): 293-310.

Jaworski M. D., Hunter D. L., Ward A.C. 1998. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J Vet Diagn Invest. 10:49-55.

Jericho K. W. F., Lejeune A., Tiffin G. B. 1986. Bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica* aerobiology in experimentally infected calves. Am. J. Vet. Res. 47:205-209.

Jeyaseelan S., Sreevatsan S., Maheswaran S. K. 2002. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. Anim Health Res Rev. 3:69-82.

Juárez B. F., Trigo T. F., Chávez G. G., Vargas G. R. 2003. Identificación de agentes virales por inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda. Vet. Méx. 34 (1): 1-12.

Kadurugamuwa J. L. and Beveridge T. J. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretions. J. Bacteriol. 177: 3998-4008.

Kaehler K. L., Markham R. J. F., Muscoplat C. C., Johnson D. W. 1980. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. Am. Vet. Res. 41: 1690-1693.

Katsuda K., Kamiyama M., Kohmoto M., Kawashima K., Tsunemitsu H., Eguchi M. 2006. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia. 1987-2006. J. Vet. Med. Small Anim Clin. 178 (1):146-148.

Koch A. L. 1998. The biophysics of the gram-negative periplasmic space. Crit. Rev. Microbiol. 24:23-59.

Koch A. L. and Woeste S. W. 1992. The elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174:4811-4819.

Kovacsovics B. M. and Rock K. L. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. Science. 267(5195): 243-246.

Kuehn M. J., Kesty N. C. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the hostpathogen interaction. *Genes Dev* 19:2645-2655.

Kyd J. M., Taylor D., Cripps A. W. 1994. Conservation of immune responses to proteins isolated by preparative polyacrylamide gel electrophoresis from the outer membrane of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 62: 5652-5658.

Laemmli W. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Lafleur R. L., Abrahamsen M. S., Maheswaran S. K. 1998. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 66:4087-4092.

Lafleur R. L., Malazdrewich C., Jeyaseelan S., Bleifield E., Abrahamsen M. S., Maheswaran S. K. 2001. Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog.* 30:347-357.

Laurance O. W., Maheswaran K. S., Douglas J. W., Trevor R. A., Mathur S. K. 1992. *Pasteurella haemolytica* A1 and Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis. *Jour. Vet. Int. Med.* 6: 11-22.

Lea-Master B. R., Evermann J. F., Lemkuhl H. D. 1987. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootia of respiratory tract disease in recently weaned lambs. *J. Am. Vet. Med.* 190: 1545-1547.

Lee R. W., Strommer J., Hodgins D., Shewen P. E., Niu Y., Lo R. Y. 2001. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect Immun.* 69:5786-5793.

Leite F., O'brien S., Sylte M. J., Page T., Atapattu D., Czuprynski C. J. 2002. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils *in vitro*. *Infect Immun.* 70:4336-4343.

Lequin R. M. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry.* 51(12): 2415-2418.

Liu S. L., Schryvers A., Sanderson K., Johnston R. 1999. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *J Bacteriol.* 181:6747-6755.

Lo R. Y. 2001. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol.* 83:23-35.

Lo R. Y. 2008. Development of transgenic alfalfa expressing antigens of *Mannheimia hemolytica* as an oral vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis. Proceedings of the International Pasteurellaceae Society Conference 2008; 2008 Oct 12-15; Sorrento, Italia. Sorrento, Italia: International Pasteurellaceae Society. S:11.

López M. A. 2004. Patología del Sistema Respiratorio. Atlantic Veterinary College.

Loste M. J. M., Loste M. A., Capilla R. L. 2002. Eficacia de una vacuna comercial a base de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* A1 de origen bovino en ganado ovino. Departamento de Patología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. España.

Maheswaran S. K., Weiss D. J., Kannan M. S., Townsend E. L., Reddy K. R., Whiteley L. O., Srikumaran S. 1992. Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leucotoxin of bovine neutrophils: degranulation and generation of oxygen-derived free radicals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33: 51-68.

Marciel A. M., Highlander S. K. 2001. Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and cis-acting regulators of leukotoxin transcription. *Infect Immun.* 69:6231-6239.

Martínez S., Pedroso R. M., Corona G. B. 2008. Retos, expectativas y riesgos de las vacunas veterinarias. División de Microbiología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Maslow J., Mulligan M. 1993. Molecular Epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis.* 153-164.

McClenahan D., Hellenbrand K., Atapattu D., Aulik N., Carlton D.,† Kapur A.‡ and Czuprynski C. 2007. Effects of Lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin on Bovine Lung Microvascular Endothelial Cells and Alveolar Epithelial Cells. *Clin. and Vac. Immunol.* Vol. 15: 338-347.

McQuoid M. R., Hodgkinson A. J., Hodgkinson S. C. 1995. Los anticuerpos maternos y la respuesta inmune en corderos en crecimiento. *Actas de la Sociedad de Nueva Zelandia de la Producción Animal* , Tomo 55 , 214-217.

Menestina G., Mackman N., Holland I. B., Bhakdi S. 1987. Escherichia coli hemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 905. 109-117.

Narayanan S., Nagaraja T., Chengappa M., Stewart G. 2002. Leukotoxins of Gramnegative bacteria. *Vet Microbiol.* 84:337-356.

Neutra M. R. and Kozlowski P. A. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 148-158.

Oberhofer T. 1979. Comparison of the API 20E and Oxi/ Ferm Systems in identification of nonfermentative and oxidase-positive fermentative bacteria. *J Clin Microbiol.* 9:220226.

O'Hagan D. T., Rappuoli R. 2004. The safety of vaccines. *Drug Discov. Today.* 19: 846-854.

O'Hallahan J., Lennon D., Oster P. 2004. The strategy to control New Zealand's epidemic of group B meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 23:S293-S298.

Opal S. M., Palardy J. E., Chen W. H., Parejo N. A., Bhattacharjee A. K. and Cross A. S. 2005. Active immunization with a detoxified endotoxin vaccine protects against lethal polymicrobial sepsis: its use with CpG adjuvant and potential mechanisms. *J.*

Infect. Dis. 192:2074–2078. Ortíz C. O. and Czuprynsky C. J. 1992. Activation of bovine neutrophils by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is calcium dependent. *J. Leukocyte. Biol.* 52: 558-564.

Oster P., Lennon D., O'Hallahan J., Mulholland K., Reid S., Martin D. 2005. MenZB: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine.* 23:2191-2196.

Oster P., O'Hallahan J., Aaberge I., Tilman S., Ypma E., Martin D. 2007. Immunogenicity and safety of a strain-specific MenB OMV vaccine delivered to under 5-year olds in New Zealand. *Vaccine.* 25:3075-3079.

Pancier R. J., Corstvet R. E., Confer A. W., Gresham C. N. 1984. Bovine pneumonic pasteurellosis: effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am J Vet Res.* 45:2538-2542.

Pandher K., Murphy G. L. 1996. Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* 51: 331-334.

Paulsen D. B., Confer A. W., Clinkenbeard K. D., Moiser D. A. 1990. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release and neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1635-1639.

Poulsen L. L., Reinert T. M., Sand R. L., Bisgaard M., Christensen H., Olsen J. E. et al. 2006. Occurrence of haemolytic *Mannheimia* spp. in apparently healthy sheep in Norway. *Acta Vet Scand.* 47:70.

Purdy C. W., Straus D. C., Struck D., Foster G. S. 1993. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasteurellosis. *Am J Vet Res.* 54:1637- 1647.

Ratchapin S., Girish J. K., Lawrence A. H. and Justus E. D. 2002. Modulation of Gamma Interferon-Induces Major Histocompatibility Complex Class II Gene Expression by *Porphyromonas gingivalis* Membrane Vesicles. *Infec. Immnu.* 70:1185-1192.

Reséndiz M. R., Hernández J. S., Caicedo R. R., Vargas L. S., Reséndiz C. J. A. 2007. Estudio humoral en la administración de vacunas de dos laboratorios en ovinos pelibuey en el municipio de Tlacotepec, Puebla, México. *Memorias Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*, Mendoza, Argentina.

Rice J., Carrasco M. L., Hodgins D., Shewen P. 2008. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* 8 117-128.

Riquelme Z. E. 2011. Evaluación del Efecto de la Leucotoxina (LKT) de *Mannheimia Haemolytica* Serotipo A2, Secretada a Partir de Microvesículas (MVs) en Cultivo Celular de Mononucleares de Ovino. Tesis de licenciatura.

Roger J. L. 1989. Parainfluenza 3 vaccination of sheep. *Veterinary Record.* 125:435-436.

Severn W. B., Johnston R. A. Z., Leitch R. A., Richards J. C. 1992. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella haemolytica* serotype A1. *Glycobiology*. 2: 463.

Sharma S. A., Olchoway T. W. J., Breider M. A. 1992. Alveolar macrophage and neutrophil interactions in *Pasteurella haemolytica* induced endothelial cell injury. *J. Infect. Dis.* 165: 651.

Schild S., Nelson E. J. and Camilli A. 2008. Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infect. Immun.* 76:4554–4563.

Shewen P. E. and Wilkie B. N. 1982. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.* 35: 91-94.

Shewen P. E., Wilkie B. N. 1985. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1212-1214.

Sleim R. 2005. Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. El Cairo, Egypt: Bacteriology Department, Animal Health Research Institute.

Srinand S., Ames T., Maheswaran S., King V. 1995. Efficacy of various vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle: a meta-analysis. *Prev. Vet. Med.* 25: 7-17.

Stevens P. K. and Czuprynski. 1996. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis *in vitro*. *Infect. Immun.* 64:2687-2694.

Sutherland A. D. 1985. Effects of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin on ovine peripheral blood leucocytes and lymphocytes obtained from gastric lymph. *Vet. Microbiol.* 10: 431-438.

Squire P. G., Smiley D. W., Croskell R. B. 1984. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect. Immun.* 45: 667-673.

Swanson E., Collins M. 1980. Use of the API 20E system to identify veterinary Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 12:10-14.

Tashiro Y., Sakai R., Toyofuku M., Sawada I., Nakajima K. T., Uchiyama H. and Nomura N. 2009. Outer Membrane Machinery and Alginate Synthesis Regulators

Control Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*; 191(24): 7509–7519.

Tefera G., Smola J. 2001. *Pasteurella haemolytica* Complex of *Pasteurella* sensu stricto as new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. *Vet. Med.* 46, (4): 119–124.

Terri N. E, Kuehn J. 2010 .Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiol. and Mol. Biol. Reviews.* 74 (1); 8194.

Van den Dobbelen G. P., Van Dijken H. H., Pillai S. and Van Alphen L. 2007. Immunogenicity of a combination vaccine containing pneumococcal conjugates and meningococcal PorA OMVs. *Vaccine.* 25:2491–2496.

Versalovic J., Lupski J. 2002. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol.* 10:15-21.

Vilela C., Morgan K. L., Bailey M., Bland P. W., Ebrahimi C. B., Sargan D., McInnes C. 1993. The Interaction Between *Pasteurella haemolytica* and Ovine Mammary Gland Epithelium: Antigen Recognition, adherence and Cytokine Production. *National Agricultural Library.* 43: 35-39.

Villalobos C. G. 2003. Glucocorticoides. Centro Nacional de Información de Medicamentos (CIMED).

Villard L., Gauthier D., Lacheretz A., Abadie G., Game Y., Maurin F., et al. 2006. Serological and molecular comparison of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* strains isolated from wild and domestic ruminants in the French Alps. *Vet J.* 171:545-550.

Wang Z., Clarke C. and Clinkenbeard K. 1998. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increased phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. *Infect. Immun.* 66 (5): 1885-1890.

Welch R. A. 1991. Pore-forming cytolisins of Gram-negative bacteria. *Med. Microbiol.* 5: 521-528.

Wilkie B. N., Markham R. J., Shewen P. E. 1980. Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *Am J Vet Res.* 41:1773-1778.

Whitmire W. M. and Garon C. F. 1993. Specific and nonspecific responses of murine B cells to membrane blebs of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:1460–1467.

Yoo H. S., Maheswaran S. K., Lin G., Townsend E. L., Ames T. R. 1995. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolisaccharide. *Infect. Immun.* 63: 381-388.

Zecchinon L., Fett T., Desmecht D. 2005. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism. *Vet Res.* 36:133-156.

Zusheng L., Anthony J. C, and Terry J. B. 1998. Gram-Negative Bacteria Produce Membrane Vesicles Which Are Capable of Killing Other Bacteria. *J. Bacteriol.* 180(20): 5478–5483.