

240  
22

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



## EFFECTO POTENCIAL DE DIFERENTES ADYUVANTES EN LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LA INOCULACION CON CITOTOXINA DE Pasteurella haemolytica A-1 EN CONEJOS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
MA. MARLENE PULIDO FLORES

Asesores: Q.F.B. Laura Jaramillo Meza  
MVZ. MSc. PhD. Francisco Trigo Tavera



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.

## **CONTENIDO**

	<b>PAGINA</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>6</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>8</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>12</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>14</b>
<b>APENDICE</b>	<b>18</b>

## RESUMEN

### **PULIDO FLORES MA. MARLENE. EFECTO POTENCIAL DE DIFERENTES ADYUVANTES EN LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LA INOCULACION CON CITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* A-1 EN CONEJOS. (Bajo la dirección de: Laura Jaramillo Mezay Francisco José Trigo Tavera).**

Uno de los principales mecanismos de virulencia de *Pasteurella haemolytica* es la destrucción de células inmunocompetentes debido a una exotoxina o leucotoxina. Existen evidencias tanto naturales como experimentales que indican una correlación directa entre títulos de anticuerpos neutralizantes de la actividad tóxica de esta bacteria con la resistencia al daño pulmonar en rumiantes; además, se ha considerado que siendo esta leucotoxina un factor la virulencia presente en todos los serotipos de *P. haemolytica*; la inmunización con ésta puede conferir protección contra la pasteurellosis neumónica independientemente de serotipo que se trate, por lo cual el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad inmunogénica de esta exotoxina sola o con adyuvantes que potenciaran la respuesta inmune en conejos. Se utilizaron 24 conejos Nueva Zelanda de los cuales se hicieron 6 grupos de 4 animales cada uno, asignados al azar y designados como A, B, C, D, E y F. Los animales fueron inoculados de acuerdo al siguiente diseño. Grupos: A) 2 ml. de leucotoxina, B) 2 ml. de leucotoxina + adyuvante completo de Freund, C) 2 ml. de leucotoxina + adyuvante incompleto de Freund, D) 2 ml. de leucotoxina +  $Al(OH)_3$ , E) 2 ml. de suspensión de bacteria viva a una concentración de  $1 \times 10^{12}$  UFC/M., F) 2 ml. de medio RPMI. Los animales se sangraron semanalmente durante 2 meses y medio. La evaluación de la respuesta inmune sistemática inducida con los diferentes inmunógenos se determinó utilizando las pruebas de ensayo visual simple (EVS) y hemaglutinación indirecta. Los resultados se sometieron a un análisis estadístico de ANDEVA y la prueba de significancia de Tukey. Se encontró que la leucotoxina por sí sola es capaz de inducir una respuesta inmune significativa, sin embargo el uso de adyuvantes oleosos potencializó y mantuvo los niveles de anticuerpos neutralizantes de la leucotoxina por un período más prolongado, aunque es necesario realizar estudios sobre la protección que puedan conferir este tipo de inmunógenos a la neumonía causada por esta bacteria en rumiantes.

## INTRODUCCION

La pasteurelosis neumónica constituye una causa importante en las pérdidas económicas debidas a neumonías en explotaciones bovinas, ovinas y caprinas. (5,6,9). Esta enfermedad es el resultado de varios factores ambientales, como son los cambios bruscos de temperatura, transportación, hacinamiento, etc.; los que provocan un estado de estrés en los animales y como consecuencia un aumento en la concentración de corticoesteroides en el plasma, disminuyendo, la actividad leucocitaria del hospedador. Las infecciones previas por virus como el de la Parainfluenza 3, el virus respiratorio sincitial bovino, el virus de la Rinotraqueítis infecciosa Bovina ( Herpes virus 1 ), disminuyen los mecanismos de defensa del aparato respiratorio (Aparato mucociliar y Macrófagos alveolares), favoreciendo con esto la proliferación de **Pasteurella multocida** y **Pasteurella haemolytica**, que forman parte de la flora normal de la nasofaringe. (2,7,8,12,13,16,17,26,27).

En diversos estudios se ha demostrado que **Pasteurella haemolytica**, es el agente etiológico aislado más frecuentemente de neumonías en rumiantes, además de considerarse más patógena que **Pasteurella multocida**. (8,9,16,21,23).

Existen dos biotipos de **Pasteurella haemolytica**, A y T. El biotipo A, está asociado con neumonías en bovinos y ovinos y septicemia en corderos lactantes. El biotipo T se asocia a septicemia en corderos de engorda. La diferenciación de los biotipos se hace con base en la fermentación de ciertos azúcares. El biotipo A fermenta la Arabinosa y la Xilosa, mientras que el biotipo T fermenta la Trehalosa y la Salicilina. (4).

**Pasteurella haemolytica**, es una bacteria Gram negativa, capsulada, corta, inmóvil, no esporulada, bipolar y pleomórfica. (4) Este agente presenta varios factores de patogenicidad entre los que se incluyen una exotoxina, también llamada leucotoxina producida durante la fase logarítmica de crecimiento (5 a 6 horas de cultivo), y enzimas proteolíticas. Una gruesa cápsula protege a la bacteria contra la fagocitosis y efectos opsonizantes; además, su glicocálix le permite adherirse y ejercer directamente su efecto citopático sobre las células blanco. Por otro lado, una superficie compuesta de lipopolisacárido con actividad endotóxica, que induce efectos vasculares locales o sistémicos, es uno de los

mayores determinantes antigénicos que el sistema inmune del animal reconoce en Pasteurella haemolytica además de proteínas de membrana y fimbrias (6,14).

Las lesiones producidas por esta bacteria consisten en una severa neumonía fibrinosa caracterizada por la acumulación de macrófagos alveolares y algunos neutrófilos en los espacios alveolares. Existen estudios que indican que los macrófagos alveolares tienen un papel importante en la migración de neutrófilos, ya que producen un factor quimiotáctico para neutrófilos en presencia de bacterias, partículas no infectivas y complejos inmunes. El lipopolisacárido de Pasteurella haemolytica genera y libera un factor quimiotáctico para los neutrófilos de los bovinos cuando reacciona con el suero normal de bovino o secreciones broncoalveolares. Este factor quimiotáctico ayuda a explicar la acumulación de neutrófilos entre los alveolos pulmonares en la pasteurelosis neumónica.

La cápsula de la bacteria es antifagocítica, pero la presencia de opsoninas en el suero de animales adultos facilita la fagocitosis por el macrófago alveolar aunado al efecto de las opsoninas termolábiles (complemento). (2,12).

Estudios experimentales han demostrado que en presencia de opsoninas, en 24 horas Pasteurella haemolytica es fagocitada y degradada completamente por los macrófagos alveolares cuando la relación bacteria/macrófago alveolar es baja d:1, pero cuando la relación bacteria/macrófago alveolar es mayor se ocasiona la muerte del leucocito debida a la actividad leucotóxica de la bacteria. Así al ser destruidas estas células fagocíticas que son mecanismos importantes de defensa del pulmón, se liberan enzimas proteolíticas y mediadores químicos de la inflamación que dañan el tejido pulmonar. (3,6).

La citotoxina de Pasteurella haemolytica, se produce durante la fase logarítmica de crecimiento de la bacteria. Es tóxica para los leucocitos de rumiantes, pero no para otras células por lo que también se le denomina leucotoxina. Tiene un peso de alrededor de 150,000 Daltons, es termolábil, estable en un amplio rango de pH y estable en presencia de O<sub>2</sub>, es decir no se oxida fácilmente; no es dializable, es soluble en agua y no tiene actividad hemolítica sobre eritrocitos de ovinos y bovinos. (2,7,10,15,16,18).

La leucotoxina es antigénica y se ha sugerido su uso como inmunógeno, para la prevención de la pasteurelosis neumónica. Existen evidencias tanto experimentales como naturales que indican una correlación directa entre los títulos de anticuerpos neutralizantes de la leucotoxina con la resistencia a la pasteurelosis neumónica. (16,21,24).

Estudios experimentales utilizando a la bacteria viva como inmunógeno, mostraron que los animales inmunizados desarrollaron anticuerpos a varios antígenos incluyendo los de la pared celular, cápsula y leucotoxina.

El efecto benéfico de las vacunas se explica por el hecho de que los micro-organismos vivos, se replican permitiendo así la producción y liberación de la citotoxina y su reconocimiento como antígeno. Comparativamente con las bacterias formalinizadas (bacterinas), los antígenos dirigidos contra la cápsula y la citotoxina no se desarrollan en cantidades adecuadas debido a que la bacteria muerta no produce ni secreta citotoxina y la cantidad o tamaño de la cápsula es muy pequeña. (6,14)

Estudios previos han mostrado un efecto adverso en la vacunación contra la pasteurelisis neumónica usando bacterinas, debido a que éstas inducen una estimulación de la respuesta inmune de los antígenos de superficie (anticuerpos opsonizantes), facilitando la ingestión de la bacteria opsonizada por el macrófago alveolar, el cual muere por el efecto citotóxico que no fue neutralizado al no producirse anticuerpos neutralizantes contra la leucotoxina con este tipo de inmunógeno. (24).

Las bacterinas con diferentes adyuvantes como el Adyuvante completo de Freund (ACF), Adyuvante incompleto de Freund (AIF) y el Hidróxido de Aluminio  $Al(OH)_3$ , han mostrado diferente capacidad protectora ante desafíos experimentales. El  $Al(OH)_3$  fue inefectivo en reducir las lesiones en pulmón, mientras que el ACF y el AIC, si fueron efectivos en la protección contra los signos y lesiones de la pasteurelisis neumónica, debido a que estimulan altos títulos de anticuerpos contra los antígenos capsulares y somáticos de Pasteurella haemolytica. (14)

Se ha considerado, que siendo la citotoxina un factor de virulencia presente en todos los serotipos de Pasteurella haemolytica, la inmunización con ésta puede conferir protección contra la actividad tóxica de la leucotoxina. Además de que se ha descrito existe neutralización cruzada entre los antisueros tipo específico. (21)

## OBJETIVOS

Probar la citotoxina con diferentes adyuvantes que potencialicen la respuesta inmune en conejos.

Evaluar la respuesta inmune inducida por la citotoxina como inmunógeno para la prevención de la pasteurelosis neumónica.

## HIPOTESIS

Siendo la citotoxina de Pasteurella haemolytica uno de los principales factores de virulencia y por ende uno de los principales mecanismos de patogenicidad, es posible que la estimulación de anticuerpos neutralizantes por la inoculación de esta exotoxina ya sea sola o con adyuvante permita el desarrollo de una inmunidad efectiva contra la pasteurelosis neumónica.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 24 conejos Nueva Zelanda de 2 Kg. de los cuales se integraron 6 grupos de 4 animales cada uno, asignados al azar y designados como A,B,C,D,E y F.

Antes de ser inmunizados se les efectuó un examen bacteriológico a partir de exudado nasal, con la finalidad de determinar si el aparato respiratorio alto de estos animales se encontraba o no colonizado por Pasteurella sp.

Los animales fueron inoculados por vía subcutánea con los diferentes inmunógenos a probar; de acuerdo con el siguiente diseño:

- A.- Citotoxina de Pasteurella haemolytica A1
- B.- Citotoxina de Pasteurella haemolytica A1 más Adyuvante Completo de Freund.
- C.- Citotoxina de Pasteurella haemolytica A1 más Adyuvante Incompleto de Freund.
- D.- Citotoxina de Pasteurella haemolytica A1 más Hidróxido de Aluminio.
- E.- Bacteria viva en solución Buffer de Fosfatos a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC.
- F.- Medio RPMI + suero. (Testigo)

La citotoxina se preparó como se muestra en el apéndice.

Los animales fueron sangrados semanalmente durante dos y medios meses.

La evaluación de la respuesta inmune sistémica inducida por los diferentes inmunógenos se determinó a partir de las muestras de suero colectadas antes del inicio del experimento y cada semana posterior a la inoculación.

La respuesta inmune inducida contra los antígenos de superficie se evaluó por la prueba de hemoaglutinación indirecta. (4)

La actividad neutralizante dirigida contra la citotoxina, se determinó por la prueba del ensayo visual simple. (9)

Los títulos serológicos obtenidos con la prueba de hemoaglutinación indirecta, y los de la prueba de ensayo visual simple se expresaron logarítmicamente en base 2; para facilitar la interpretación de los datos y someterlos a un análisis estadístico utilizando la prueba de análisis de varianza con un diseño en arreglo factorial anidado con rompimiento en tiempo. (19)

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + A(i)_j + D_k + TD_{ik} + e(i)_{jkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$  = es la  $i$ -ésima observación asociada al  $K$ -ésimo tiempo de muestreo, al  $j$ -ésimo animal dentro de tratamiento y al  $i$ -ésimo tratamiento.

$\mu$  = Media de la población.

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i=1-6$ ).

$A(i)_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo animal anidado en el  $i$ -ésimo tratamiento ( $j=1-4$ ).

$D_k$  = Efecto del  $k$ -ésimo tiempo de medición o muestreo ( $k=1-9$ ).

$TD_{ik}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo tratamiento con el  $k$ -ésimo tiempo de medición.

$e(i)jkl = \text{error aleatorio asumiendo } NID(0, \sigma^2)$ .

Se realizó la comparación múltiple de las medias, fue realizada con la prueba de significancia de Tukey.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos con la prueba de ensayo visual simple para los diferentes tratamientos administrados se muestran en el Cuadro 1, donde se expresan como promedios mínimos cuadráticos, transformados a log. 2

Se observa que los grupos que recibieron la leucotoxina con adyuvantes oleosos, así como el grupo inoculado con la bacteria en fase logarítmica presentaron los niveles de anticuerpos más altos, en comparación con los otros tratamientos ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, entre éstos grupos, los animales que recibieron la citotoxina + ACF presentaron la máxima respuesta observada.

Por el contrario, en el grupo de animales inoculados con citotoxina +  $Al(OH)_3$  se observó la respuesta más baja, menor aún que la del grupo inoculado con la citotoxina sola.

En la Figura 1 se observa que para el grupo A (citotoxina) el título más alto de anticuerpos neutralizantes se presentó a los 8 días postinoculación y éstos fueron descendiendo en forma gradual hasta casi desaparecer a los 71 días; para los grupos B y C, la actividad neutralizante a los 8 días postinoculación fue significativa ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, esta llegó a un nivel máximo a los 27 días en el caso del grupo B (citotoxina + ACF) y para el grupo C (citotoxina + AIF) a los 21 días, para ambos grupos los niveles de anticuerpos eran todavía significativos a los 71 días.

En el grupo D (citotoxina +  $Al(OH)_3$ ) se observó la respuesta más baja durante todo el tiempo que duró el experimento y la máxima actividad neutralizante que se presentó en este grupo fue a los 15 y 21 días postinoculación, a partir de ese momento los niveles de anticuerpos descendieron en forma gradual hasta ser detectados en niveles muy bajos.

En el caso, del grupo inoculado con la bacteria viva en fase logarítmica (grupo E) se observó una máxima respuesta a los 8 y 21 días, la cual descendió ligeramente a los 27 días, para posteriormente mantenerse en niveles comparables y significativos a la de los grupos B y C al término del experimento.

CUADRO 1

PROMEDIOS MINIMO CUADRATICOS DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA CITOTOXINA EN CONEJOS UTILIZANDO LA TECNICA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE.

DIA	GRUPO A cito	GRUPO B cito + ACF	GRUPO C cito + AIF	GRUPO D cito Al(OH) <sub>3</sub>	GRUPO E Bacteria	GRUPO F TESTIGO	TOTAL
0	0	0	0	0	0	0	0
8	5.75	5.33	5.25	2.50	6.00	0	5.04a
15	5.50	6.66	5.25	2.75	5.50	0	5.15a
21	4.50	6.99	5.75	2.75	6.00	0	5.20a
27	4.00	6.66	6.00	2.00	5.00	0	4.73ac
36	3.50	6.33	5.50	1.75	5.00	0	4.41bc
56	2.00	6.66	5.50	1.25	5.00	0	4.04bd
65	1.75	5.99	5.00	0.50	4.75	0	3.75de
71	0.50	5.33	4.75	1.00	4.25	0	3.15e
TOTAL	3.44c	6.25a	5.38a	1.81b	5.19a	0	4.32

a, b, c, d, e. Distintas literales indican diferencias significativas  $p < .01$

TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA EN  
 CONEJOS CON LA PRUEBA DE EVS.

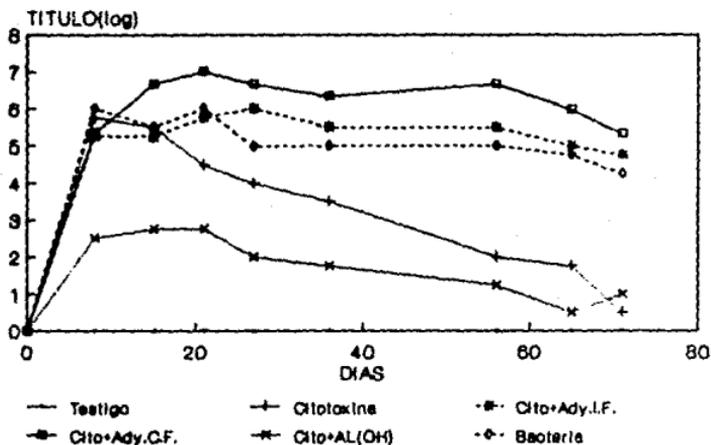


Fig. 1

En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos con la prueba de hemaglutinación indirecta, los cuales también se expresan como promedios mínimo cuadráticos transformados a log. 2. Se observa que hay diferencias entre grupos ( $p. 0.01$ ) y en cuanto a días de muestreo ( $p. 0.01$ ).

Los niveles de anticuerpos anticápsula más altos y significativos observados durante el experimento se encontraron en el grupo B (citotoxina + ACF), el grupo E (bacteria) presentó también una respuesta significativa pero menor a la del grupo C.

El grupo C (citotoxina + AIF) presentó una respuesta intermedia entre el grupo E y el grupo testigo. Para los grupos A y D la respuesta observada no fue significativa y estadísticamente es comparable a la del grupo testigo F.

La Figura 2 muestra el comportamiento observado para los diferentes tratamientos en los diferentes días de muestreo, se observa que la mejor respuesta se presentó en el grupo B (citotoxina + ACF) durante todos los muestreos siendo ésta respuesta máxima a los 15 días postinoculación tiempo a partir del cual se observó un descenso gradual que se estabilizó entre los días 36 y 56 para posteriormente descender en forma brusca.

El grupo inoculado con la bacteria presentó también una respuesta máxima a los 15 días postinoculación la cual descendió para tender a estabilizarse a niveles bajos pero detectables durante los posteriores días del muestreo. En el grupo C (citotoxina + AIF) se observan dos máximos en los niveles de anticuerpos anticápsula que se presentan a los 8 y 21 días a partir de ese momento los niveles descienden a valores muy bajos.

Para los grupos A y D se observan niveles de anticuerpos detectables pero no significativos durante los 27 días postinoculación, posteriormente los niveles de anticuerpos desaparecen.

El Cuadro 3 muestra el análisis de varianza observado para los diferentes tratamientos utilizando las pruebas de Ensayo visual simple y hemaglutinación indirecta de forma general, indicando que existen diferencias entre tratamientos ( $p. 0.01$ ) y en días de muestreo para las dos pruebas; se observa además, que en el

CUADRO 2

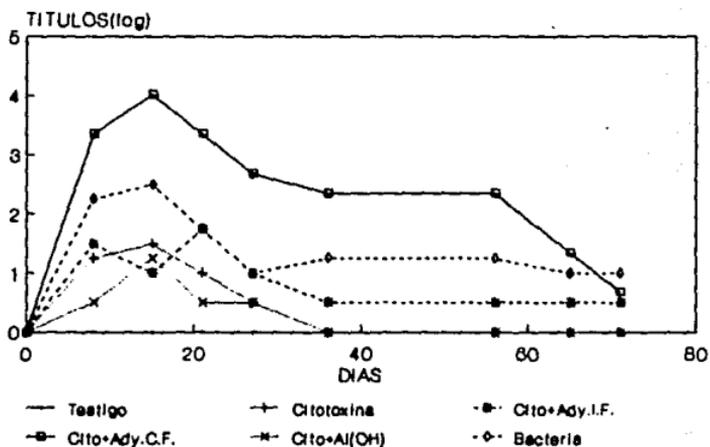
PROMEDIOS MINIMO CUADRATICOS DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA CITOTOXINA EN CONEJOS UTILIZANDO LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

DIA	GRUPO A cito	GRUPO B cito + ACF	GRUPO C cito + AIF	GRUPO D cito + AI(OH) <sup>3</sup>	GRUPO E Bacteria	GRUPO F TESTIGO	TOTAL
0	0	0	0	0	0	0	0
8	1.25	3.35	1.50	0.50	2.25	0	1.76ab
15	1.50	4.02	1.00	1.25	2.50	0	2.02a
21	1.00	3.35	1.75	0.50	1.75	0	1.65ac
27	0.50	2.68	1.00	0.50	1.00	0	1.12bcd
36	0	2.35	0.50	0	1.25	0	0.81d
56	0	2.35	0.50	0	1.25	0	0.80d
65	0	1.35	0.50	0	1.00	0	0.60d
71	0	0.68	0.50	0	1.00	0	0.49d
TOTAL	0.53cd	2.50a	0.91bc	0.34cd	1.50b	0d	1.09

a, b, c, d. Distintas literales son diferentes p < .01

5.

**TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA EN  
CONEJOS CON LA PRUEBA DE HI.**



*Fig. 2*

caso de ensayo visual simple hubo efecto de interacción entre el  $i$ -ésimo tratamiento con el  $k$ -ésimo tiempo de medición.

CUADRO 3

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS UTILIZANDO LAS  
TECNICAS DE ENSAYO VISUAL SIMPLE (EVS) Y HEMAGLUTINACION  
INDIRECTA (HA1).

ORIGEN DE VARIACION	g. l.	CUADRADOS MEDIOS	
		EVS	HA1
TRATAMIENTO ANIMAL DENTRO DE TRAT	4	93.81**	22.99**
DIA	7	5.47	3.83
TRAT*DIA	28	11.14**	6.36**
ERROR R CUADRADA	98	2.27**	0.52
		0.44	0.61

\*\* P < .01

## DISCUSION

Los resultados del presente trabajo indican que la inoculación de citotoxina de Pasteurella haemolytica A-1 en conejos estimula la producción de anticuerpos neutralizantes y que el uso de adyuvantes oleosos amplifica considerablemente esta respuesta ya que además de incrementar la actividad neutralizante la mantiene por un periodo prolongado en niveles significativos, lo cual no se observó en el grupo inoculado con citotoxina más hidróxido de aluminio como adyuvante, donde la respuesta fue aún mucho menor que la observada al emplear la citotoxina sola como inmunógeno.

La citotoxina empleada en este experimento es un sobrenadante de cultivo de P. haemolytica A-1 libre de células o citotoxina cruda que además de presentar actividad citotóxica contiene antígenos solubles de la superficie bacteriana, razón por la cual la prueba de hemaglutinación indirecta detectó niveles de anticuerpos anticápsula o anticuerpos dirigidos contra el material soluble, al utilizarse la citotoxina como inmunógeno ya sea sola o con los diferentes adyuvantes.

Resultados similares fueron observados por Shewen y Wilkie (24) al utilizar sobrenadantes de cultivo con actividad leucotóxica de los serotipos A-1 y A-11 de P. haemolytica junto con adyuvante completo de Freund como inmunógeno en becerros. Estos investigadores observaron que este tipo de inmunógenos estimulan una respuesta antitóxica y aglutinante seroespecífica, además proponen que el desarrollo de una inmunidad efectiva contra la pasteurelisis neumónica requiere de la presencia de ambos tipos de anticuerpos.

El utilizar la bacteria viva en fase log. como inmunógeno en este experimento fue con la idea de tener un punto de comparación de las respuestas inducidas con los diferentes inmunógenos ya que la bacteria al estar en fase activa produce y libera citotoxina permitiendo su reconocimiento como antigéno; además, el tamaño de la cápsula es mayor en esta fase (3,17).

El grupo inoculado con la bacteria viva presentó actividad neutralizante de la citotoxina comparable estadísticamente a la de los grupos inoculados con la citotoxina más adyuvantes oleosos; pero, la estimulación de anticuerpos

anticápsula fue mayor en el grupo inoculado con la citotoxina más adyuvante completo de Freund, seguido del grupo inoculado con la bacteria.

Los niveles de anticuerpos anticápsula observados en el grupo inoculado con citotoxina más adyuvante incompleto de Freund fue todavía más baja que la respuesta observada con la bacteria viva, lo cual muestra la poca inmunogenicidad que presenta este material capsular y a la vez sugiere la amplificación de una respuesta inmune debida a la acción del adyuvante completo de Freund.

Adiam (1) ha mostrado que el polisácarido capsular de *P. haemolytica* es inmunogénica para rumiantes, pero no para conejos; causa probable de los bajos niveles de anticuerpos anticápsula observados en la mayoría de los grupos.

Un trabajo realizado por Sutherland et. al. (25) pone de manifiesto la importancia de este material capsular que en combinación con la citotoxina ofreció un 98% de protección al desafío en corderos inmunizados; la citotoxina sola protegió un 86% y el material capsular obtenido con salicilato dió solamente una protección del 47%. En ese trabajo se estableció una correlación directa entre protección y títulos neutralizantes contra citotoxina y la actividad bactericida, estimulados ambos por los antígenos contenidos en la preparación de citotoxina, lo cual pone de relevancia la sugerencia hecha por Shewen y Wilkie (24) .

De acuerdo con los resultados obtenidos, que indican que el uso de adyuvantes oleosos incrementan de manera favorable la actividad neutralizante de la citotoxina y dado que esta es un factor relevante de la virulencia de *P. haemolytica*, deben realizarse estudios sobre la protección que pueden conferir este tipo de inmunogénos a la neumonía causada por esta bacteria en rumiantes.

## LITERATURA CITADA

- 1.- Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Baker, P.R.W., Beesley, J.E., Spacey, B., Craig, G.R., Nagy, L.K.: purification, characterization and Immunological Properties of the Sero-Type-Specific Capsular Polysaccharide of Pasteurella haemolytica (Serotype A1) organisms. J.Gen.Microb. **130**: 2415-2426 (1984).
- 2.- Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Bemrick W.J., Maheswaran S.K.: Interaction of Pasteurella haemolytica with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. Am. J. Vet. Res. **42**: 1920-1926 (1981).
- 3.- Berggren K.A., Baluyut C.S., Simonson R.T., Maheswaran S.K.: Cytotoxic effects of Pasteurella haemolytica on bovine neutrophils. Am. J. Vet. Res. **42**: 1383-1388 (1981).
- 4.- Biberstein E.L.: Biotyping and serotyping of Pasteurella haemolytica In: Methods an Microbiolgy. Edited by: Bergan, T. and Morris, J.R. New York **10**: 253-269 (1978).
- 5.- Craft, D.L., Chengappa, M.M., Carter, G.R.: Differentiation of Pasteurella haemolytica biotypes A and T with lectins. Vet. Rec. **120**: 393 (1987)
- 6.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Moiser, D.A.: Bovine pneumoic pasteurellosis: Immunity to Pasteurella haemolytica, J.A.V.M.A. **193**: 1308-1316 (1988)
- 7.- Chang Y.F., Renshaw, H.W., Richards, A.B., Pasteurella haemolytica leukotoxin physicochemical characteristics and susceptibility of leukotoxin to enzymatic treatment. Am. J. Vet. Res. **47**: 716-723 (1986)

- 8.- Chang, Y.F., Young, R.Y., Post, D., Struck, D.: Identification and characterization of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. **55**: 2348-2354 (1987)
- 9.- Gentry, M.J., Confer, A.W., Keeps, J.A.: Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titres in cattle sera. J. Clin. Microb. **22**: 968-972 (1985)
- 10.- Himmel, M.E., Yates, M.D., Laureman, L.H., Squiere, P.G.: Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. **43**: 764-767 (1982)
- 11.- Kaehler, K.I., Maskham, R.J., Muscoplat, C.C., Johnson, D.W.: Evidence of cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine peripheral blood mononuclear leucocytes. Am. J. Vet. Res. **41**: 1690-1693 (1980)
- 12.- Maheswaran, S.K., Berggren, K.A., Simonson, R.R., Ward, G.E., Muscoplat, C.C.: Kinetics of interaction and fate of *Pasteurella haemolytica* in bovine alveolar macrophages. Infect. Immun. **30**: 254-262 (1980)
- 13.- Markhan, R.J., Wilkie, B.N.: Interaction between *Pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages: Cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. Am. J. Vet. Res. **41**: 18-22 (1980)
- 14.- Moiser, D.A., Confer, A.W., Panciera, R.J.: The evolution of vaccines of bovine pneumonic pasteurellosis. Res. Vet. Sci. **47**: 1-10 (1989)
- 15.- Moiser, D.A., Simons, K.R., Confer, A.W., Panciera, R.J., Clinkenbeard, K.D.: *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infect. Immun. **57**: 711-716 (1989)
- 16.- Moore, R.N., Walker, R.D., Shaw, G.A., Hopkins, F.M., Shull, E.P.: Antileukotoxin antibody produced in the bovine lung after aeroexposure

- to viable *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 46: 1949-1952 (1985)
- 17.- Panciera, R.J., Corstvet, R.E., Confer, A.W., Gresham, C.N.: Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of vaccination with live *Pasteurella* species. Am. J. Vet. Res. 45: 2538-2542 (1984)
- 18.- Richards, A.B., Renshaw, H.W.: Bovine pneumonic pasteurellosis: Evaluation of interactions between bovine pulmonary lavage cells and *Pasteurella haemolytica* (biotype A, serotype 1), using a luminol dependent chemiluminescence assay. Am. J. Vet. Res. 47: 1217-1224 (1986)
- 19.- SAS Institute Inc.: SAS User's guide Basics, Cary. SAS Institute Inc. North Carolina 1982
- 20.- Shewen, P.E., Wilkie, B.N.: Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. Infect. Immun. 35: 91-94 (1982)
- 21.- Shewen, P.E., Wilkie, B.N.: *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by type specific rabbit antisera. Am. J. Vet. Res. 44: 715-719 (1983)
- 22.- Shewen, P.E., Wilkie, B.N.: *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing activity in the sera from Ontario beef cattle. Can. J. Comp. Med. 47: 497-498 (1983)
- 23.- Shewen, P.E., Wilkie, B.N.: Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxic as product of actively growing bacteria. Am. J. Vet. Res. 46: 1212-1214 (1985)
- 24.- Shewen, P.E., Wilkie, B.N.: Vaccination of calves with leucotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. Can. J. Vet. Res. 52: 30-36 (1988)

- 25.- Sutherland, A.D., Donachie, G.E., Jones, H.Q.: A Crude Cytotoxin protects Sheep against experimental Pasteurella haemolytica Serotype A-2 infection. Vet. Microbiol **19**: 175-181 (1989)
- 26.- Walker, R.D., Corsvet, R.E., Panciera, R.J.: Study of bovine pulmonary response to Pasteurella haemolytica: Pulmonary macrophage. Am. J. Vet. Res. **41**: 1008-1014 (1980)
- 27.- Wilkie, B.N. Markhan, R.J., Shewen P.E.: Response of calves to lung challenge exposure with Pasteurella haemolytica after parenteral or pulmonary immunization. Am. J. Vet. Res. **41**: 1773-1778 (1980).

## APENDICE

### PRODUCCION DE CITOTOXINA DE Pasteurella haemolytica

Se cultivó Pasteurella haemolytica durante 6 horas en Agar sangre, suplementado con extracto de levadura y 5% de suero equino. Se cosecharon las bacterias para producir un inóculo al 10%, el paquete de bacterias se resuspendió en medio RPMI, suplementado con suero fetal de ternera al 7%. Se incubó a 37° C por 5 horas en baño maría con agitación constante. Se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se esteriliza por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m (18), se distribuyó en viales y se liofilizó manteniéndose a -20 C. La citotoxina se tituló mediante la prueba del Ensayo visual simple. (9)

### ENSAYO VISUAL SIMPLE

La prueba se desarrolló en placas para microtitulación de 96 pozos con fondo plano. Se inactivaron los sueros a ser probados sometiéndolos a baño María (56 C por 30 minutos). Se realizaron diluciones dobles de los sueros directamente en las placas, para lo cual se vertieron 50  $\mu$ l de PBS en cada pozo. Se agregaron 50  $\mu$ l de suero a probar en cada uno de los pozos de la fila A de la placa. Se hicieron las diluciones con un microdilutor. Posteriormente se agregaron a cada pozo 100  $\mu$ l de la citotoxina previamente reconstituida con agua destilada a una concentración de 1.5 x. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37° C, y se centrifugaron 10 minutos a 2000 rpm. Se decantó el sobrenadante por inversión rápida de la placa. Se colocaron 100  $\mu$ l de formalina al 10% en cada pozo, y se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos. En seguida se agregó cristal violeta en solución acuosa al 1% y se dejó durante 5 minutos. Por último se lavaron las placas y se dejaron secar a temperatura ambiente, para después realizar la lectura.

Un fondo azul de las placas indicó la integridad de los leucocitos, los cuales absorbieron el colorante y por lo tanto, la presencia de anticuerpos que fueron capaces de neutralizar la citotoxina de Pasteurella haemolytica. Un fondo claro indicó la ausencia de anticuerpos, por lo que la citotoxina quedó libre, ejerciendo su efecto sobre los leucocitos. El título de anticuerpos en el suero se representa por la última dilución donde se presenta un fondo azul. (8)

## PREPARACION DE LEUCOCITOS

Se obtuvo sangre heparinizada de bovino, se hizo una lisis hipotónica con agua destilada. Entre cada lisis los leucocitos se centrifugaron a 2000 rpm. El paquete final se resuspendió en medio RPMI, ajustando la concentración final a 10 células por ml.

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA

Para la sensibilización de glóbulos rojos con antígeno capsular de P. haemolytica se inocularon frascos conteniendo 50 ml de caldo infusión cerebro corazón, incubándose a 37°C durante 18 hrs. en baño maría con agitación constante. Posteriormente, los cultivos se inactivaron calentándolos a 56 C por 30 minutos en baño María. Después de que los cultivos se enfriaron (+ ó - 35 C) se les agregó 0.5 ml del paquete de glóbulos rojos de bovino y se incubaron nuevamente a 37C por 1 hora en baño María, después se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se repitió la operación. Los glóbulos rojos sensibilizados se suspendieron en un volumen final de 100 ml en PBS (pH 7.2) quedando suspensiones de 0.5% de eritrocitos sensibilizados.

Los sueros a probar se inactivaron a 56 C por 30 minutos y diluidos 1:2 con PBS. 0.015M pH 7.2. La prueba se efectuó en placas para microtitulación de 96 pozos con fondo en "U" en cada uno de los pozos se colocó una gota de 0.025 ml de diluyente (PBS).

En cada pozo de la hilera horizontal (A) de la placa, se colocaron 0.025 ml de cada uno de los sueros; posteriormente se hicieron diluciones dobles con ayuda de un microdilutor hasta la dilución 1:512. A todos los pozos se les agrega una gota de la suspensión de eritrocitos sensibilizados. Después de 24 horas a 4° C, se observó el fondo de los pozos para ver hasta qué dilución había hemoaglutinación y así determinar los títulos del suero.