



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO 2

C 116643

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN" 200

COORDINACION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION EXPERIMENTAL Y EN CAMPO DE UN
INMUNOGENO DE Pasteurella haemolytica
EN CORDEROS

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL
(ovinos y caprinos)

P R E S E N T A
JOSE FRANCISCO MORALES ALVAREZ

DIRECTOR: MVZ DMC JORGE L. TORTORA PEREZ
ASESOR: MVZ PhD. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA
ASESOR TECNICO: OFB LAURA JARAMILLO MEZA



ESTADO DE MEXICO

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

LISTA DE CONTENIDO:

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
HIPOTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y METODOS:	
FASE I. EVALUACION EXPERIMENTAL	
ANIMALES.....	13
INMUNOGENOS.....	13
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
EXAMEN CLINICO.....	16
ESTUDIOS SEROLOGICOS.....	16
EXAMEN BACTERIOLOGICO.....	16
EXAMEN MACROSCOPICO.....	16
EXAMEN HISTOPATOLOGICO.....	17
ENSAYO SIMPLE VISUAL PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE <u>Pasteurella</u> <u>haemolytica</u>	17
HEMOAGLUTINACION INDIRECTA PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE <u>Pasteurella</u> <u>haemolytica</u>	18
OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES.....	19
SUSPENSIONES BACTERIANAS PARA LA EVALUACION DE FAGOCITOSIS Y EFECTO BACTERICIDA.....	20
EVALUACION DE FAGOCITOSIS.....	20
EVALUACION DE EFECTO BACTERICIDA.....	21

FASE II. EVALUACION DEL INMUNOGENO EN CONDICIONES	
DE CAMPO.....	22
RESULTADOS:	
FASE EXPERIMENTAL.	
TEMPERATURA.....	27
TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA.....	27
TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA.....	28
TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE PI3...	29
FRECUENCIA RESPIRATORIA.....	29
EVALUACION DEL DAÑO PULMONAR.....	29
EXAMEN HISTOPATOLOGICO.....	30
EVALUACION DE FAGOCITOSIS Y EFECTO BACTERICIDA	
DE <i>P. haemolytica</i> POR MACROFAGOS ALVEOLARES.....	31
EXAMEN BACTERIOLOGICO.....	32
GANANCIA DE PESO.....	32
FASE DE CAMPO.	
EVALUACION CLINICO-PATOLOGICA.....	32
EVALUACION SEROLOGICA.....	32
DISCUSION.....	60
CONCLUSIONES.....	69
LITERATURA CITADA.....	70

LISTA DE CUADROS:

Página

CUADRO 1. PROTOCOLO DE INMUNIZACION Y DESAFIO DE <u>Pasteurella haemolytica</u> EN CORDEROS.....	24
CUADRO 2. ARREGLO FACTORIAL DEL DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA EL EXPERIMENTO DE EVALUACION DEL INMUNOGENO DE <u>P. haemolytica</u> EN CORDEROS.....	25
CUADRO 3. PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACION DE LAS LESIONES DEL PULMON.....	26
CUADRO 4. ANALISIS DE VARIANZA PARA ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE <u>P. haemolytica</u>	34
CUADRO 4a. PROMEDIOS DE MINIMOS CUADRATICOS PARA ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE <u>P. haemolytica</u>	34
CUADRO 5. ANALISIS DE VARIANZA PARA ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE <u>P. haemolytica</u>	35
CUADRO 5a. PROMEDIOS DE MINIMOS CUADRATICOS PARA ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE <u>P. haemolytica</u>	35
CUADRO 6. ANALISIS DE VARIANZA PARA FRECUENCIA RESPIRATORIA DE CORDEROS.....	36
CUADRO 7. PROMEDIOS DE MINIMOS CUADRATICOS DEL DAÑO PULMONAR EN CORDEROS.....	37
CUADRO 7a. ANALISIS DE VARIANZA EN LA EVALUACION DEL DAÑO PULMONAR EN CORDEROS.....	37
CUADRO 8. EVALUACION DEL DAÑO PULMONAR DE ACUERDO A LA ESCALA DE 0 a 20.....	38

CUADRO 9. GANANCIA DE PESO DIARIA EN CORDEROS.....	39
CUADRO 10. TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA Y ANTICITOTOXINA DE <i>P. haemolytica</i> DE CORDEROS EN LA EVALUACION EN CAMPO.....	40

LISTA DE FIGURAS:

Página.

FIGURA 1. CAMARA DE AEROLIZACION UTILIZADA PARA LA EXPOSICION VIRAL.....	23
FIGURA 2. TEMPERATURA RECTAL DE CORDEROS.....	41
FIGURA 3. ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE <u>Pasteurella</u> <u>haemolytica</u> EN CORDEROS.....	42
FIGURA 4. ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE <u>P. haemolytica</u> EN CORDEROS.....	43
FIGURA 5. FRECUENCIA RESPIRATORIA DE CORDEROS MOSTRANDO EL EFECTO DEL CAMBIO A CONDICIONES ADVERSAS DE ALOJAMIENTO.....	44
FIGURA 5a. FRECUENCIA RESPIRATORIA DE CORDEROS.....	45
FIGURA 6. DAÑO PULMONAR EN CORDEROS DEL GRUPO CONTROL.....	46
FIGURA 7. DAÑO PULMONAR EN CORDEROS DEL GRUPO INMUNIZADO POR VIA SUBCUTANEA.....	47
FIGURA 8. DAÑO PULMONAR EN CORDEROS DEL GRUPO INMUNIZADO POR VIA INTRADERMICA.....	48
FIGURA 9. DAÑO PULMONAR EN CORDEROS DEL GRUPO INMUNIZADO CON CITOTOXINA.....	49
FIGURA 10. EVALUACION DEL DAÑO PULMONAR POR EL PESO DE LAS IMPRESIONES EN PAPEL.....	50
FIGURA 11. MICROFOTOGRAFIA MOSTRANDO EL PATRON FUSIFORME DE MACROFAGOS ALVEOLARES.....	51

FIGURA 12. MICROFOTOGRAFIA MOSTRANDO EDEMA PULMONAR.....	51
FIGURA 13. MICROFOTOGRAFIA MOSTRANDO ENGROSAMIENTO DE DE SEPTOS INTERLOBULILLARES.....	52
FIGURA 14. MICROFOTOGRAFIA MOSTRANDO PLEURITIS.....	52
FIGURA 15. FAGOCITOSIS EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE CORDEROS.....	53
FIGURA 16. FAGOCITOSIS EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE CORDEROS CON ADICION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS EN EL MEDIO.....	54
FIGURA 17. EFECTO BACTERICIDA POR MACROFAGOS ALVEOLARES DE CORDEROS.....	55
FIGURA 18. ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE <u>P. haemolytica</u> EN CORDEROS: Fase de Campo.....	56
FIGURA 19. ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE <u>P. haemolytica</u> EN CORDEROS: Fase de Campo.....	57
FIGURA 20. ANTICUERPOS ANTICAPSULA Y ANTICITOTOXINA EN CORDEROS: Fase de Campo.....	58
FIGURA 21. ANTICUERPOS ANTICAPSULA Y ANTICITOTOXINA EN ANIMALES ENFERMOS: Fase de Campo.....	59

EVALUACION EXPERIMENTAL Y EN CAMPO DE UN INMUNOGENO DE Pasteurella haemolytica EN CORDEROS.

RESUMEN

Se evaluó en condiciones experimentales y de campo la inmunización de corderos, contra la pasteurelisis neumónica, con bacterias vivas y citotoxina de Pasteurella haemolytica. Para la evaluación experimental se utilizaron 40 corderos que fueron distribuidos al azar en 4 grupos. El grupo 1 fue el lote control al cual se le inoculó, por vía subcutánea, sólo medio de cultivo; el grupo 2 fue inmunizado con un cultivo vivo de P. haemolytica serotipo A1 por vía subcutánea; el grupo 3 recibió el mismo inmunógeno por vía intradérmica y al grupo 4 le fue inoculada la citotoxina de P. haemolytica por vía subcutánea más adyuvante completo de Freund. Tres semanas después de la inmunización, los animales fueron expuestos por nebulización con el virus de PI3 y siete días después, desafiados con una cepa de campo de P. haemolytica A1 y sacrificados al día 35 post-inmunización para la evaluación del daño pulmonar. A los animales se les tomó diariamente la temperatura corporal por vía rectal durante el período experimental. Se tomaron muestras de suero para la determinación de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de P. haemolytica por hemaglutinación indirecta y ensayo visual simple respectivamente. Por otro lado, se tomaron impresiones en papel de las lesiones pulmonares para su evaluación por peso y se recolectaron macrófagos alveolares para ensayos de fagocitosis y efecto bactericida. Por otro lado, la evaluación en campo se realizó en cinco explotaciones de la zona del Ajusco, México D.F. Se inmunizaron 96

corderos con un cultivo vivo de P. haemolytica por vía subcutánea y quedaron 81 corderos sin inmunizar como grupo control, al igual que en la evaluación experimental se determinaron anticuerpos anticápsula y anticitotoxina; además se realizó un estudio clínico patológico en los corderos hasta el destete.

En la evaluación experimental, los animales del grupo testigo mostraron fiebre después del desafío bacteriano durante 4 días. Los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina fueron más altos para los grupos inmunizados comparados con el grupo testigo ($p < 0.05$). Por otro lado, las lesiones en pulmón, fueron más severas para el grupo control ($p < 0.05$). La fagocitosis por macrófagos alveolares fue más eficiente para los grupos inoculados por vía intradérmica y con citotoxina más adyuvante.

En la evaluación de campo, los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina mostraron seroconversión a la inmunización ($p < 0.05$). En el grupo control enfermaron de neumonía clínica 4 animales (4.9 %) y del grupo vacunado 1 animal (1.0 %). De acuerdo con los resultados obtenidos se puede considerar que la protección conferida por la inmunización con P. haemolytica así como con citotoxina, es eficiente para reducir en forma considerable las lesiones pulmonares ocasionadas por esta bacteria experimentalmente. Por otro lado, las observaciones a nivel campo sugieren que la inmunización con bacterias vivas podría reducir la incidencia de neumonías causadas por P. haemolytica. También se demostró la inocuidad de los inmunógenos por la ausencia de reacciones post-vacunales.

EVALUACION EXPERIMENTAL Y EN CAMPO DE UN INMUNOGENO DE Pasteurella haemolytica EN CORDEROS.

INTRODUCCION

Las neumonías son consideradas de suma importancia en los animales domésticos debido a que afectan directamente al proceso productivo de las explotaciones comerciales. Las pérdidas económicas que ocasionan se deben al alto costo de los tratamientos contra la enfermedad, la pérdida de peso, las bajas conversiones alimenticias que conllevan a retraso en el crecimiento de los animales y finalmente por la mortalidad ocasionada en las poblaciones susceptibles (5, 61).

Estudios realizados en México, destacan la importancia de las 30 neumonías en becerros, ya que clínicamente la incidencia y prevalencia alcanza hasta un 24 % en la etapa de lactancia (5). Por otro lado, el 39 % de los corderos que fueron sometidos a necropsia en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM durante 1983 presentaron lesiones neumónicas de intensidad moderada y severa (93). En investigaciones realizadas en rastros de la Ciudad de México se aisló Pasteurella haemolytica en aproximadamente el 14 % de pulmones neumónicos de ovinos, siendo los serotipos A1, A2, A5 y A9 los más representativos (10, 18).

En estudios sobre mortalidad de corderos se ha determinado que la muerte de corderos asociada a neumonías puede rebasar el 20 %. En estos trabajos se ha demostrado que el mayor porcentaje de mortalidad por problemas neumónicos se acentúa entre los 2 y 3 meses de edad de los corderos (70,96).

En otro estudio realizado por Aguilar y Tórtora (1) donde se evaluó la mortalidad perinatal en ovinos de la zona de Milpa Alta, D.F. se demostró que la cifra alcanzada por neumonías era del 12 %. Un resultado similar fue obtenido por Martínez, et al. (63) en la zona de influencia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México.

Pasteurella haemolytica es un agente que comunmente se asocia a problemas neumónicos de ruminantes (2). La primera información del problema apareció en 1921, donde se aisló el germen de ruminantes y en 1932 se propuso el nombre de Pasteurella haemolytica (8, 66). Es una bacteria Gram (-) de forma cocobacilar, inmóvil, encapsulada, oxidasa (+), indol (-), aerobia y anaerobia facultativa; crece en agar Mc Conkey, en medios enriquecidos como agar sangre y agar chocolate; produce hemólisis beta. La presencia de cápsula con determinantes de superficie antifagocíticos la hace resistente a la fagocitosis (28).

Por mucho tiempo, se desconoció la importancia de P. haemolytica y P. multocida en el proceso de la enfermedad respiratoria, ya que no son capaces por sí solas en condiciones experimentales de causar la enfermedad, sólo cuando se estableció la idea de complejo neumónico de etiología múltiple y secuencial se comenzó a considerar que estas bacterias podían ser invasoras secundarias y responsables de producir lesiones graves en el pulmón (95).

El pulmón del rumiante tiene un eficiente sistema de defensa y puede eliminar prácticamente todas las partículas, por mecanismos inespecíficos que involucran la filtración aerodinámica, cambios bruscos en la dirección del aire en las vías respiratorias y el

desplazamiento del moco, al cual las partículas pueden adherirse y ser eliminadas por el movimiento ciliar ascendente (38). Las partículas con diámetros comprendidos entre 0.5 y 2 μm , tamaño al cual corresponden la mayoría de las bacterias, pueden franquear los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del aparato respiratorio superior y logran llegar hasta la pared del alveolo. A este nivel existen otros mecanismos de defensa que son capaces de neutralizar a las bacterias; el principal responsable de esta inactivación es el macrófago alveolar, pero existen otras sustancias que ayudan a la protección del tejido pulmonar, entre ellas se encuentran las inmunoglobulinas, lisozima, transferrina, interferón, antitripsina y complemento (38, 39, 95). La remoción de bacterias en pulmón también es eficiente, ya que en estudios realizados por diversos autores y utilizando varios modelos animales, se ha determinado que el tiempo de eliminación de bacterias del pulmón en raras ocasiones excede las 12 horas (62,82).

De P. haemolytica se han reconocido, por hemoaglutinación indirecta, 15 serotipos de acuerdo a antígenos capsulares solubles (31, 91). Estos antígenos son básicamente polisacáridos y lipopolisacáridos con capacidad antigénica alta. Asimismo, se han designado los biotipos A y T de acuerdo a características bioquímicas de la bacteria (8). Los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 corresponden al biotipo A que produce neumonía y septicemia en corderos y neumonía en borregos adultos. Los serotipos 3, 4, 10 y 15 pertenecen al biotipo T, causante de septicemia en adultos (92).

Pasteurella haemolytica produce en fase logarítmica de crecimiento una sustancia soluble que es tóxica para macrófagos y leucocitos en general (7, 42, 83, 86). La citotoxina, también llamada leucotoxina, es soluble en agua, consta principalmente de dos fracciones; una proteica y un carbohidrato, es sensible a tripsina debido al componente proteico esencial, su actividad citotóxica óptima es a 37 C y se inhibe a 4 C, es estable a ph de 2 a 12 y resiste el calor hasta 60 C (92).

La leucotoxina es producida por los diferentes serotipos capsulares de P. haemolytica, presenta las mismas características en todos ellos, por lo cual se ha considerado que la inmunización con ésta puede conferir protección contra la actividad tóxica, independientemente del serotipo que se encuentre involucrado en la neumonía (23).

En trabajos de ingeniería genética se ha demostrado que la leucotoxina de P. haemolytica es codificada por dos genes denominados lktC y lktA. Con estas técnicas se determinó que la toxina de Escherichia coli y de Pasteurella haemolytica, tienen características similares y se sugiere la posibilidad de que los genes de ambas estén relacionados filogenéticamente (54).

Esta leucotoxina es una citolisina productora de poros, compuesta por dos o más subunidades proteicas con pesos moleculares de 105 mil daltones, que daña a las células blanco por un mecanismo similar al de otras citolisinas bacterianas, insertándose en la membrana citoplasmática con la resultante formación o producción de un poro transmembranal, permitiendo la salida de potasio intracelular e incorporación de calcio y sodio extracelular, con ello la presión osmótica intracelular se hace más alta y la célula

se hincha con la consecuente lisis y salida de componentes citoplasmáticos (17).

Durante la fase temprana de crecimiento logarítmico de la bacteria, se ha observado por microscopia electrónica la presencia de fimbrias y glicocálix bacteriano. Las fimbrias son de aproximadamente 5 nm de ancho y de 300 nm de longitud, están presentes sólo cuando la bacteria se cultiva de manera estacionaria. Por otro lado, el tamaño del glicocálix es de 150 nm de grosor y su tamaño disminuye cuando los cultivos tienen más de 18 horas de incubación. La función que puedan tener este tipo de estructuras con los mecanismos de patogenicidad se desconocen; sin embargo, se cree que las fimbrias favorecen la colonización a nivel del aparato respiratorio alto actuando como un factor de unión de la bacteria a las células epiteliales de la mucosa nasofaríngea, mientras que el glicocálix puede conferir a la bacteria las propiedades antifagocíticas (28, 89).

Otra habilidad de la bacteria es que forma parte de la flora normal de las vías respiratorias altas (3, 37, 40, 75, 77). Se menciona que los factores predisponentes juegan un papel determinante en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo: las condiciones medio ambientales adversas como temperatura baja, humedad alta y ventilación deficiente, aunados a la mala alimentación pueden favorecer la presentación del complejo respiratorio (1).

Es evidente que estos factores favorecen el proceso neumónico, sin embargo, el papel que juegan se basa más en experiencias prácticas que en ensayos experimentales. En México se han hecho los primeros

intentos para evaluar el efecto de las condiciones medio ambientales y de manejo en la presentación de neumonías. En estos estudios se deja entrever que en explotaciones donde existe hacinamiento, microbismo ambiental alto, humedad alta y mala ventilación se presentan más cuadros neumónicos en los animales, comparado con otros sistemas de explotación (1).

Se señala que las condiciones antes mencionadas, generan situaciones de estrés para el animal que facilitan la transmisión de agentes infecciosos. El estrés es una reacción neuroendocrinológica ampliamente definida que incluye la elevación de los niveles de esteroides endógenos. Si el estrés se mantiene por un período prolongado, la hipersecreción de corticoesteroides compromete la respuesta del hospedador a los agentes infecciosos debido a una inhibición en la liberación de factores quimiotácticos por parte de los macrófagos alveolares, complementado con un bloqueo en la unión de factores quimiotácticos a los granulocitos e inhibiendo la capacidad de migración del macrófago alveolar (95).

También se ha demostrado la participación de agentes primarios de tipo viral como adenovirus, virus respiratorio sincitial, parainfluenza 3, entre otros, capaces de iniciar el complejo neumónico, sin embargo, el mecanismo de como actúan no se ha definido satisfactoriamente (52, 56).

Todos estos factores inhiben de una u otra forma los mecanismos de defensa del pulmón permitiendo el establecimiento de P. haemolytica en el tejido pulmonar (26, 56, 64). Además, la citotoxina puede jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad por el ya mencionado efecto negativo que ejerce sobre los principales

mecanismos de defensa del pulmón, especialmente sobre los macrófagos alveolares y neutrófilos, ocasionando inhibición de su capacidad fagocítica, de la respuesta inmune subsecuente y de la inducción de inflamación como consecuencia de la lisis de estas células (7, 27, 42, 60, 83, 84, 86, 90).

La lesión pulmonar causada por P. haemolytica se inicia a nivel del bronquiolo respiratorio, mientras que la difusión de la infección ocurre a través del tejido conjuntivo intersticial presente entre los bronquios, vasos sanguíneos y linfáticos. La lesión característica inducida es una pleuroneumonía fibrinosa localizada en la zona craneoventral del pulmón (8). La endotoxina de P. haemolytica es en parte responsable del daño severo que se observa en la neumonía, debido a que es capaz de activar los sistemas enzimáticos de la coagulación, fibrinolítico y del complemento (28, 95).

En la actualidad se han desarrollado una diversidad de inmunógenos para prevenir la neumonía causada por P. haemolytica con resultados aparentemente satisfactorios en algunos casos (21). Estos inmunógenos varían en cuanto a la vía de inoculación, adyuvantes utilizados, tipo de antígenos: vivos (21), muertos (22), extractos (29, 33) y masa antigénica. El uso de bacterinas día con día se va desechando, debido a que no han tenido efecto en la prevención del problema y evidencias clínicas muestran que animales bacterinizados han desarrollado una neumonía más severa al desafío comparado con los animales no bacterinizados (22).

Los inmunógenos a base de bacterias vivas de cultivos de 6 horas son los que han dado resultados más satisfactorios, argumentándose que este tipo de biológicos son eficaces debido a que los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico entre el que se encuentra material capsular, citotoxina y otros carbohidratos no muy bien definidos. También la replicación del agente en el sitio de la inoculación favorece la estimulación de los mecanismos inmunológicos mediados por células (21).

El uso de extractos obtenidos por diversos métodos, ha dado resultados muy limitados debido a la escasa variedad de compuestos inmunogénicos que se logran purificar (29, 33).

Al comparar las vías de administración utilizadas en los experimentos se ha demostrado que las de mayor efectividad son: la vía subcutánea, intradérmica y aerolizada para el caso de bacterias vivas; en tanto que para bacterias muertas la vía subcutánea es la más efectiva, sin embargo, para este caso el uso de un adyuvante se hace indispensable (22).

La evaluación de los inmunógenos se ha realizado por diversos métodos que incluyen la reducción del daño pulmonar y muerte de los animales, asociación con la respuesta inmune humoral medida por seroconversión de inmunoglobulinas, la respuesta inmune celular y la disminución de manifestaciones clínicas (21, 22, 29, 33, 99).

HIPOTESIS:

De los métodos de inmunización utilizados, son escasos los que evalúan la efectividad de los inmunógenos asociándolos con factores predisponentes de tipo ambiental, de manejo y nutricionales que de alguna u otra forma interactúan en el proceso neumónico.

En México, a pesar de los malos resultados que se han obtenido con las bacterinas, se siguen utilizando con mucha frecuencia sin saber a ciencia cierta su eficacia, los serotipos contenidos en las bacterinas y si son los adecuados para su utilización en la región geográfica donde van a ser aplicados.

OBJETIVOS.

Evaluar a nivel experimental la efectividad de un inmunógeno de Pasteurella haemolytica y el efecto de condiciones de alojamiento (hacinamiento y humedad) sobre la presentación de neumonías.

Estudiar algunos aspectos generales de la respuesta inmune a la neumonía como son la fagocitosis y capacidad bactericida por macrófagos alveolares in vitro. Así como, el comportamiento de los títulos séricos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de P. haemolytica.

Determinar en pruebas de campo la inocuidad del inmunógeno y su efecto sobre la presentación de neumonías en animales inmunizados y no inmunizados hasta el destete.

MATERIAL Y METODOS.

La evaluación del inmunógeno se realizó en dos fases, una a nivel experimental y otra a nivel campo.

FASE I. EVALUACION EXPERIMENTAL:

ANIMALES. Se utilizaron 40 corderos de aproximadamente dos meses de edad, clínicamente sanos procedentes de explotaciones con baja incidencia de neumonías. A todos los animales se les tomó muestra de sangre y suero para la determinación de títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *P. haemolytica* por hemoaglutinación indirecta y por ensayo simple visual respectivamente. También se realizó un examen coproparasitoscópico de los animales y se tomaron hisopos nasales estériles para análisis bacteriológico.

INMUNOGENOS. Se utilizó un cultivo de 6 horas de *P. haemolytica* serotipo A1 aislado de pulmón neumónico de ovino suspendida en solución salina amortiguada (SSA) a una concentración de 1×10^9 UFC de paquete celular libre de citotoxina. También se preparó un inmunógeno a base de citotoxina de *P. haemolytica*, obtenida en fase de crecimiento logarítmico concentrada 10X por liofilización y titulada por medio del ensayo visual simple (34).

DISEÑO EXPERIMENTAL. Los animales se asignaron al azar en cuatro grupos de 10 animales cada uno. El grupo 1 fue el grupo control, en el cual los animales recibieron como inóculo medio de cultivo estéril. Los animales de los grupos 2 y 3 fueron inmunizados por vía subcutánea e intradérmica respectivamente con 2.0 ml de *P. haemolytica* viva en cultivo de 6 horas. El grupo 4 se inmunizó utilizando como antígeno 2.0 ml de la citotoxina de *P. haemolytica*

suspendida en adyuvante completo de Freund (ACF) por vía subcutánea. Cada grupo se subdividió a su vez en subgrupos de 5 animales, los subgrupos fueron sometidos a condiciones adversas de alojamiento (Cuadro 1 y 2). Las condiciones adversas se referían a acúmulo de excretas y orina (humedad), así como hacinamiento de 1 animal por metro cuadrado y sin ventilación. El alojamiento de los otros subgrupos no presentaba el acúmulo de excretas, el grado de hacinamiento era de 2.0 metros por animal y con buena ventilación. La exposición viral se llevó a cabo el día 21 post-inmunización y el desafío bacteriano al día 28. La elección del día de desafío bacteriano estuvo basada en las manifestaciones clínicas ocasionadas por la infección viral (Cuadro 1).

El diseño estadístico que se utilizó para las variables anticuerpos anticápsula, anticitotoxina, contra el virus de PI3, temperatura y frecuencia respiratoria fue uno completamente al azar con arreglo factorial, anidado con rompimiento en tiempo con dos factores y diferentes niveles para cada factor (Cuadro 2).

El modelo matemático quedó de la siguiente forma:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + A_j + TA_{ij} + I_k (TA_{ij}) + D_l + TD_{il} + AD_{jl} + E_{ijklm}$$

μ = Media general.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

A_j = Efecto del j-ésimo alojamiento.

TA_{ij} = Efecto debido a la interacción Tratamiento x Alojamiento

$I_k(TA_{ij})$ = Efecto debido al animal anidado en el Tratamiento x Alojamiento.

D_l = Efecto del l-ésimo día de muestreo.

TDil= Efecto de la interacción Tratamiento x Día de muestreo.

ADjl= Efecto de la interacción Ambiente x Día de muestreo.

Eijklm= error aleatorio.

El diseño para la evaluación del daño pulmonar fue similar pero sin la anidación y el rompimiento en tiempo, quedando el modelo de la siguiente manera:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + TA_{ij} + E_{ijk}$$

donde:

μ = Media general.

Y_{ijk} = daño pulmonar en mg.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

A_j = Efecto del j-ésimo alojamiento.

TA_{ij} = Efecto de la interacción Tratamiento x Alojamiento

E_{ijk} = error aleatorio.

El virus de PI3 a utilizar fue aislado en México de un pulmón de ovino y se replicó en cultivos celulares y se mantuvo en congelación hasta su uso, momento en el cual fue titulado (45).

La exposición viral se realizó en una cámara de aerolización (Figura 1) y el desafío bacteriano por vía intratraqueal, en tanto, los cambios a condiciones de alojamiento adversas se llevaron a cabo en un lapso no mayor de tres horas. Se utilizaron 6 ml por animal de suspensión viral la cual contenía una dosis de 1×10^7 TCID₅₀/ml, la cual se define como la cantidad de virus contenido en 50 μ l que causa el 50 % de efecto citopático en cultivo de tejidos.

El flujo de la suspensión por los nebulizadores era de

aproximadamente 1 ml por minuto (16, 48, 55). Por otra parte, la dosis bacteriana utilizada fue de 2.5 ml de una suspensión de P. haemolytica a una concentración de 1×10^9 UFC por animal.

EXAMEN CLINICO. A todos los animales se les tomó la temperatura corporal por vía rectal diariamente por la mañana, durante todo el período de evaluación, así como su estado clínico general evaluado mediante la frecuencia respiratoria y tipo de movimientos respiratorios.

ESTUDIOS SEROLOGICOS: Antes y durante el período experimental o al momento de la muerte natural o sacrificio de los animales se tomaron muestras de suero para determinar títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de P. haemolytica, así como anticuerpos contra el virus de PI3 mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (31, 45).

EXAMEN BACTERIOLOGICO: Se tomaron muestras en condiciones de esterilidad para intentar recuperar la cepa de desafío o de otros agentes involucrados en el complejo respiratorio. El aislamiento e identificación de los agentes aislados se realizó por métodos convencionales (102).

EXAMEN MACROSCOPICO.- La severidad de las lesiones en pulmón fue evaluada por una escala de 0 a 20 en base a una modificación hecha al criterio descrito por Panciera (74) (Cuadro 3), los animales muertos por neumonía tendrían la máxima puntuación representando una falla total en la resistencia al desafío. El porcentaje de reducción en las lesiones fue determinado por medio de la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de reducción de la lesión} = \frac{\text{Área de lesión más grande en el animal encontrada*} - \text{Área de lesión más grande encontrada}}{\text{Área de lesión más grande encontrada}} \times 100$$

* Sin incluir a los animales muertos en forma natural y muertos por otras causas.

Con el fin de evaluar cuantitativamente el daño pulmonar se tomaron impresiones en papel de la extensión de las lesiones en pulmón de todos los grupos para su evaluación por peso. El criterio tomado fue que las lesiones más extensas ocuparían más espacio en los diagramas de papel, por lo que al recortar las áreas dibujadas el peso del papel sería alto, relacionándose por consiguiente con la mayor severidad de la lesión.

EXAMEN HISTOPATOLOGICO: Se tomaron muestras representativas de pulmón de los animales al momento de su muerte o sacrificio, las cuales fueron fijadas en formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina, procesadas y teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina para su evaluación microscópica (57).

ENSAYO SIMPLE VISUAL PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE Pasteurella haemolytica. Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tiene el suero para neutralizar la citotoxina de P. haemolytica, utilizando como células "blanco", leucocitos de sangre periférica de bovino obtenidas mediante choque hipotónico de sangre completa (67). La prueba consistió en hacer

diluciones dobles de cada uno de los sueros a probar con SSA en una placa de microtitulación de 96 pozos. Realizada la dilución de suero, se agregó la citotoxina de P. haemolytica obtenida en fase logarítmica de crecimiento bacteriano (84) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, enseguida se añadió la suspensión de leucocitos y se incubó una hora a 37 C. Al finalizar este período, las placas se centrifugaron a 500 G por 5 minutos, a cada pozo se le adicionó formalina amortiguada al 10 ‰, y fue incubada 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron teñidas las placas con una solución de cristal violeta al 1.0 ‰ durante 5 minutos, lavándose finalmente éstas con agua corriente (34). Si era observado un fondo azul en los pozos indicaba la presencia de células teñidas y por lo tanto un resultado positivo a la existencia de anticuerpos que fueron capaces de neutralizar la citotoxina de P. haemolytica. Un fondo claro indicaba ausencia de anticuerpos, por lo que la citotoxina quedaba libre ejerciendo su efecto de lisis sobre las células "blanco", eliminando el sustrato celular a teñir. Para cada ensayo se utilizaron sueros controles positivos y negativos como referencia.

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE Pasteurella haemolytica. Se realizaron diluciones dobles con cada uno de los sueros a probar con SSA en placas de microtitulación de fondo en "U" de 96 pozos. Se adicionaron los eritrocitos sensibilizados con P. haemolytica del serotipo a probar y se incubó por dos horas a 37 C. Al finalizar este período se realizó una primera lectura y se incubaron las placas durante toda la noche a temperatura ambiente para realizar

posteriormente la segunda lectura de las placas (31).

OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES. En los animales muertos en forma natural y en los sacrificados se recolectaron macrófagos alveolares mediante lavados bronquioalveolares utilizando una modificación a la técnica descrita por Mauderly (65) en animales de laboratorio, para lo cual los corderos fueron desangrados y se disecó con todo cuidado el aparato respiratorio desde la tráquea. Se tomaron las muestras para bacteriología e histología del lado izquierdo del pulmón. El lado derecho fue utilizado para realizar el lavado bronquioalveolar ligando previamente a nivel de la bifurcación bronquial. Se introdujo un tubo de polipropileno al bronquio hasta sentir una ligera resistencia; a través de la sonda se introdujeron alícuotas de una solución salina amortiguada suplementada con glucosa (98), hasta completar un volumen aproximado de 150 a 200 ml. La suspensión que contenía las células pulmonares se depositó en tubos de centrifuga de polivinil de 50 ml, los cuales se colocaron en baño de agua fría aproximadamente a 4 C.

El número de células obtenidas se determinó por conteo directo en el hemocitómetro de Neubauer (6). Para determinar la viabilidad de las células se utilizó la técnica de exclusión de azul de tripan en solución al 0.2 % (67).

Las células recolectadas fueron lavadas por centrifugación tres veces a 200 G durante 10 minutos con medio RPMI-1640 ajustando finalmente la concentración a 3×10^4 células por ml. en medio RPMI-1640 adicionado con 10 % de suero fetal de ternera (SFT). En

microplacas para cultivo de células de 24 pozos, se adicionó en forma estéril 2 ml de la suspensión celular y se incubó toda la noche a 37 C, en una atmósfera con 2 % de CO₂ para facilitar la adherencia de las células a la superficie de plástico de las placas. Al finalizar este período, se eliminaron las células no adherentes mediante el lavado de los pozos tres veces con SSA estéril y se procedió a la evaluación de fagocitosis y efecto bactericida por macrófagos alveolares (MA).

SUSPENSIONES BACTERIANAS PARA LA EVALUACION DE FAGOCITOSIS Y EFECTO BACTERICIDA. Se utilizó una cepa aislada en México de P. haemolytica, biotipo A, serotipo 1. Las bacterias se cultivaron 12 horas antes de su uso en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) a 37 C en una atmósfera con 2 % de CO₂. Transcurrido el período de incubación se realizó un conteo de las bacterias, con dilución previa en pipeta de Thoma para glóbulos rojos, en hemocítómetro de Neubauer utilizando para el conteo un microscopio en contraste de fases. Posteriormente se centrifugaron a 3 000 G por 10 minutos para resuspender en medio RPMI-1640 con 10 % de SFT a una concentración aproximada de 1.5×10^5 bacterias por ml (4).

EVALUACION DE FAGOCITOSIS. Se adicionó a 6 pozos con MA adheridos, 2 ml de la suspensión de P. haemolytica, para obtener así aproximadamente una concentración de 5 bacterias por macrófago; a otros 6 pozos con MA sólo se les adicionó RPMI-1640; a 6 pozos sin MA se les adicionó una suspensión de P. haemolytica y finalmente a otros 6 les fueron adicionados 2 ml de medio RPMI- 1640 estéril. De esta manera quedaron las siguientes variables: P. haemolytica en suspensión con MA, P. haemolytica sola como control positivo de crecimiento bacteriano, RPMI-1640 solo como control negativo de

crecimiento bacteriano y MA solos. Las muestras fueron incubadas a 37 C con 2 % de CO₂ por periodos de 1, 3, y 5 horas. Al término de cada período, se realizó la lectura de 2 pozos por cada variable en un espectrofotómetro a 380 nm, tomando como fundamento que a mayor concentración de bacterias, mayor sería la lectura en el espectrofotómetro (4).

EVALUACION DE EFECTO BACTERICIDA. Se adicionó la suspensión de E. haemolytica a 6 pozos con MA adheridos. Se incubaron durante 30 minutos a 37 C en una atmósfera con 2 % de CO₂ para facilitar la fagocitosis de bacterias; después de este período, se lavaron los pozos con SSA estéril y se provocó lisis celular en 3 pozos con agua destilada estéril para la liberación de las bacterias fagocitadas. El resto de los pozos se resuspendieron con medio RPMI-1640 adicionado con antibióticos y SFT; se incubaron durante 3 horas más en las mismas condiciones de atmósfera y temperatura. Al concluir este tiempo fue realizado el lavado de los pozos con SSA estéril y los MA se lisaron con agua destilada estéril. Inmediatamente después de cada lisis (a los 30 minutos y a las 3 horas), se tomaron por duplicado alícuotas del sobrenadante de cada pozo y se realizaron diluciones logarítmicas de cada muestra en caldo nutritivo y se incubaron a 37 C por un período de 24 horas, al término del cual fueron leídas las muestras en un espectrofotómetro a 380 nm (4).

Las muestras evaluadas a los 30 minutos se tomaron como parámetro comparativo de fagocitosis bacteriana y las de 3 horas como el efecto bactericida de los MA.

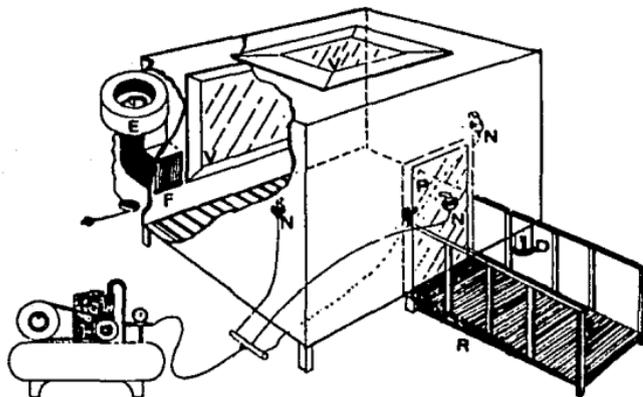
Para la evaluación de fagocitosis y efecto bactericida se

trabajaron paralelamente las mismas variables adicionando al medio anticuerpos específicos contra P. haemolytica en cantidades subaglutinantes (67). Los anticuerpos estaban contenidos en un suero ovino, el cual fue titulado por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

FASE II. EVALUACION DEL INMUNOGENO EN CONDICIONES DE CAMPO:

En la evaluación de campo se requirió de productores "voluntarios" que permitiesen la inmunización de un porcentaje de sus animales con el inmunógeno evaluado en la fase experimental. El inmunógeno fue aplicado por vía subcutánea a corderos entre 1 y 2 meses de edad. Los parámetros evaluados fueron: anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de P. haemolytica y título de anticuerpos contra el virus de PI3 antes y después de la inmunización. Se evaluó la mortalidad perinatal hasta el destete determinando las causas que la ocasionaron, considerando análisis bacteriológico con aislamiento y serotipificación de los agentes involucrados; patología macroscópica y microscópica, estudios serológicos, etc. Se trabajó con cinco explotaciones ovinas localizadas en la zona del Ajusco, México D.F. El total de corderos en los cinco rebaños fue de 177, de los cuales se inmunizaron 91 por vía subcutánea con una suspensión de P. haemolytica a una concentración de 1×10^9 UFC por ml.

FIGURA 1. CAMARA DE AEROLIZACION UTILIZADA PARA LA EXPOSICION VIRAL EN CORDEROS.



23

VISTA ISOMETRICA. P: Puerta; R: Rampa de acceso; V: Ventana;
F: Filtro; E: Extractor; N: Nebulizador;
D: Drenaje.

Tomada de Colmenares (19).

CUADRO 1. PROTOCOLO DE INMUNIZACION Y DESAFIO DE Pasteurella haemolytica EN CORDEROS.

DIA	GRUPO 1	GRUPO 2	Grupo 3	GRUPO 4
0	Inoculado con SSA vía SC	Vacunado Ph A1 vía SC	Vacunado Ph A1 vía ID	Vacunado Citox.+ACF Vía SC
21	Virus P13 aerolizado en todos los grupos mas cambio a condiciones adversas de alojamiento a los subgrupos.			
28	Desafío con <u>P. haemolytica</u> serotipo A1 en todos los grupos y cambio a condiciones adversas de alojamiento a los subgrupos.			
35	Sacrificio de los animales remanentes para evaluación.			

SC: Subcutáneo.

ID: Intradérmica.

Ph A1: Pasteurella haemolytica A1.

Cada grupo de 10 animales subdivididos a su vez en subgrupos de 5 animales cada uno.

CUADRO 2. ARREGLO FACTORIAL DEL DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA EL EXPERIMENTO DE EVALUACION DEL INMUNOGENO DE Pasteurella haemolytica EN CORDEROS.

FACTOR A : INMUNOGENO				

NIVELES	a1	a2	a3	a4
	control	Ph1 SC	Ph1 ID	Citox
F				
A				
C	b1		S/CCAA	
T				
O				
R				
B	b2	C/CCAA		

 Ph1 SC: Inmunógeno de P. haemolytica por vía subcutánea.

Ph1 ID: Inmunógeno de P. haemolytica por vía intradérmica.

Citox: Inmunógeno a base de citotoxina .

S/CCAA : Sin cambio a condiciones adversas de alojamiento.

C/CCAA: Con cambio a condiciones adversas de alojamiento.

CUADRO 3. PROCEDIMIENTO DE EVALUACION DE LAS LESIONES DEL PULMON CON BASE A LA ESCALA DE 0 a 20. MODIFICADA DE PANCIERA (74)

Puntos máximos	Distribución de puntos	Criterio
Tamaño de la lesión	6	Lesión al 75% de la lesión más grande
	4	Lesión entre el 50 y 74 %
	2	Lesión entre el 25 y 49 %
6	0	Lesión menor al 25 %
Lóbulos afectados	6	6 lóbulos
	5	5 "
	4	4 "
6	3	3 "
	2	2 "
	1	1 "
	0	0 "
Edema	4	Obvio y severo
	2	Observable pero moderado
4	0	Mínimo o carente.
Pleuritis	4	Evidente.
4	2	Moderada.
	0	Ausente.

RESULTADOS:

FASE EXPERIMENTAL:

El factor alojamiento no mostró efecto en las variables estudiadas excepto para la variable frecuencia respiratoria.

TEMPERATURA. Al día siguiente de la aplicación de los inóculos se observó en promedio un incremento ligero de temperatura en los grupos con excepción del grupo control, este incremento bajó gradualmente hasta valores normales en un período de tres días. La temperatura promedio más alta registrada durante el experimento fue 40.02 ± 1.0 C, se presentó al día siguiente del desafío bacteriano y sólo ocurrió en el grupo control mostrando diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los demás grupos. Esta elevación de temperatura tuvo duración de un solo día y disminuyó en forma gradual hasta alcanzar valores considerados como normales (Figura 2).

TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA: Los títulos de anticuerpos en general fueron transformados a logaritmo base 2 (\log_2) para su mejor evaluación.

El análisis muestra una diferencia significativa ($p < 0.025$) con respecto a tiempo y para la interacción tratamiento por tiempo. Como puede observarse en la Figura 3, esta diferencia para el tiempo se hace notoria en la primera semana post-inmunización de los diferentes inmunógenos, donde los grupos 2, 3 y 4 muestran una seroconversión importante comparados con el grupo control existiendo una diferencia estadística significativa entre tratamientos (Cuadro 4 y 4a). Como puede observarse los títulos

de anticuerpos para los tres grupos mencionados disminuyen ligeramente durante el experimento. Es importante señalar que existe una seroconversión en el grupo control poco después del desafío experimental con P. haemolytica alcanzando un título promedio de 3.81 ± 1.053 .

Los títulos más altos alcanzados debido a los tratamientos, fueron de 4.0 ± 2.2 ; 6.0 ± 1.4 ; 6.45 ± 1.2 y 7.1 ± 1.5 para los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

El valor de r^2 para esta variable fue de 66.6.

TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA. En este caso también existió diferencia estadística significativa ($p < 0.005$) para el tiempo, entre tratamientos y para la interacción tratamiento por tiempo. En la Figura 4, se observa que la respuesta más alta estuvo dada por el grupo 4, el cual fue inoculado con la citotoxina de P. haemolytica más ACF, los grupos inoculados con la bacteria por diferentes vías se comportaron de forma similar y el grupo control fue el que presentó los títulos más bajos con una seroconversión importante después del desafío con P. haemolytica. Cabe señalar que en esta fase, los títulos de anticuerpos en los grupos 2, 3, y 4 tendieron a disminuir en forma notoria. En los Cuadros 5 y 5a se muestra la diferencia existente entre los grupos con respecto al control, donde el grupo 2 y 3 son iguales entre sí y el 4 es diferente del 2 pero similar al 3.

Los títulos anticitotoxina más altos registrados durante el experimento debido a los tratamientos fueron 4.8 ± 2.3 ; 6.34 ± 1.1 ; 6.48 ± 1.1 y 7.66 ± 0.18 para los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE PI3. Los títulos de anticuerpos contra el virus de PI3 sólo mostraron diferencia significativa para el tiempo ($p < 0.05$), esta diferencia fue debida a un incremento promedio de aproximadamente dos diluciones dobles en todos los grupos, el cual se hizo evidente en el muestreo subsecuente a la exposición viral.

FRECUENCIA RESPIRATORIA. Para esta variable solamente hubo diferencia para alojamiento y tiempo ($p < 0.05$) (Cuadro 6), la cual se presentó al momento que los animales fueron sometidos a condiciones adversas de alojamiento como fue hacinamiento y aumento de humedad relativa, así como al acúmulo de excretas y orina en el corral. El promedio de frecuencia respiratoria para los subgrupos que sufrieron este cambio fue de 36.8 ± 3.1 y de 33.8 ± 2.6 para los que no fueron sometidos a estas condiciones. Como puede observarse en la Figura 5, los subgrupos sometidos a condiciones adversas de alojamiento tuvieron en promedio una frecuencia respiratoria mayor comparada con los subgrupos que estaban en condiciones favorables de alojamiento.

A pesar de no existir diferencia significativa entre tratamientos, en la Figura 5a se puede observar aumento en la frecuencia respiratoria en todos los grupos después del desafío bacteriano y en el grupo control se observa un incremento con respecto a los demás grupos entre los días 4 y 6 post-desafío.

EVALUACION DEL DAÑO PULMONAR. En las Figuras 6, 7, 8 y 9 se presentan en forma esquematizada las lesiones encontradas a nivel

pulmonar en todos los grupos y en la Figura 10 los promedios del grado de lesión representado por el peso del papel expresado en miligramos para los mismos grupos. Como puede apreciarse las lesiones más severas se observaron en el grupo control, sin embargo, a pesar de la marcada desproporción, el grupo control fue diferente significativamente ($p < 0.05$) de los grupos 3 y 4 pero igual al grupo 2 y los grupos inmunizados fueron estadísticamente similares entre sí ($p > 0.05$) (Cuadro 7 y 7a) . El valor de r^2 para esta variable fue de 23.7.

El grado de reducción de la lesión evaluado como porcentaje fue mayor para el grupo al cual se le inoculó la citotoxina de P. haemolytica más ACF ($p < 0.05$). El Cuadro 8 muestra los valores obtenidos de la evaluación del daño pulmonar realizado de acuerdo al criterio descrito previamente, donde se puede observar, que sólo hubo diferencia significativa entre el grupo inoculado con citotoxina más ACF y el control, siendo similar a los grupos inmunizados por vía intradérmica y subcutánea.

EXAMEN HISTOPATOLOGICO. En términos generales las lesiones histopatológicas fueron de intensidad moderada a leve para los cuatro grupos. Las lesiones más evidentes se observaron en el grupo control. Debido a que no se contaba con un método cuantitativo confiable para la evaluación de estas lesiones, sólo se mencionan las que se observaron con mayor frecuencia: congestión, distensión de septos interlobulillares debido a la infiltración de células inflamatorias entremezcladas con fibrina, pleuritis, infiltración mononuclear intersticial y células fusiformes con arreglo arremolinado (Figuras 11-14). Otras

lesiones observadas con menor frecuencia fueron: edema, sincitios, hemorragias subpleurales y aumento relativo del tejido linfoide asociado a bronquios.

EVALUACION DE FAGOCITOSIS Y EFECTO BACTERICIDA DE Pasteurella haemolytica POR MACROFAGOS ALVEOLARES. Para esta variable, se debe tomar en cuenta que valores altos en la lectura del espectrofotómetro, indican concentración alta de bacterias y por lo tanto una fagocitosis deficiente por parte de los macrófagos alveolares. Las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro en este ensayo a las 3 horas de incubación fueron de 0.995 ± 0.052 ; 0.872 ± 0.25 ; 0.375 ± 0.38 y 0.322 ± 0.018 para los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. En la Figura 15 se representan en forma gráfica estos resultados. Como puede observarse, la fagocitosis fue eficiente a las 3 horas de incubación para los grupos inoculados con P. haemolytica por vía intradérmica y con citotoxina más ACF ($p < 0.05$), mientras que a las 5 horas de incubación todos los grupos tendieron a comportarse de una forma similar.

En esta misma evaluación, pero con la adición de un suero ovino, que contenía anticuerpos específicos contra P. haemolytica, en el medio donde se encontraban suspendidas las bacterias con macrófagos, se encontró que la fagocitosis fue ineficiente para los cuatro grupos y no hubo diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0.05$) (Figura 16).

Por otra parte, la capacidad bactericida de los MA fue buena para los cuatro grupos y no hubo diferencia entre los tratamientos evaluados ($p > 0.05$) (Figura 17)

EXAMEN BACTERIOLOGICO. Solamente en un animal del grupo control se logró el aislamiento de P. haemolytica serotipo A1 a partir del pulmón. Es importante señalar que este aislamiento se realizó 10 días después del desafío bacteriano.

GANANCIA DE PESO. La ganancia de peso promedio para los distintos grupos se muestra en el Cuadro 9 . Como puede apreciarse no se observó diferencia significativa entre tratamientos ni entre subgrupos, sin embargo, la ganancia de peso fue escasa para todos los grupos y en los subgrupos a los cuales se les sometió a condiciones adversas de alojamiento, esta ganancia siempre fue menor comparada con los que estaban en buenas condiciones.

FASE DE CAMPO.

EVALUACION CLINICO PATOLOGICA. Durante este período que comprendió desde la aplicación del inmunógeno (aproximadamente a los 2 meses de edad de los corderos) hasta el destete, enfermaron de neumonía clínica cinco animales. Estos animales pertenecían a una sola explotación. Por tratarse de explotaciones comerciales los animales detectados enfermos recibían tratamiento a base de quimioterapéuticos. De los cinco animales que enfermaron, cuatro pertenecían al grupo control y uno al grupo inmunizado. Todos los corderos se recuperaron por lo que fue imposible realizar estudios complementarios de patología y bacteriología, pero sí se realizaron pruebas serológicas.

EVALUACION SEROLOGICA. En el Cuadro 10 , se resumen los resultados de los títulos promedio de anticuerpos anticápsula y

anticitotoxina de P. haemolytica encontrados en animales de los grupos inmunizados, enfermos y controles. Unicamente fue posible realizar dos muestreos; uno al momento de la inoculación del antígeno y otro 15 días después de la misma. Como puede observarse, los animales inmunizados mostraron seroconversión en ambos títulos comparados con el grupo control ($p < 0.05$). El valor obtenido en el segundo muestreo para el grupo inmunizado fue de 3.24 ± 1.2 y de 3.74 ± 1.35 para anticuerpos anticápsula y anticitotoxina respectivamente y para el grupo control de 1.36 ± 1.11 y 2.4 ± 1.18 . En la Figuras 18, 19 y 20 se representan en forma gráfica estos resultados.

En el grupo de animales enfermos, el título de anticuerpos anticápsula fue de 2.0 ± 0.02 al momento de detectarse la neumonía clínica. Este título se mantuvo en el segundo muestreo realizado 15 días después. Estos animales fueron negativos a la presencia de anticuerpos anticitotoxina en el primer muestreo y 15 días después presentaron seroconversión ($p < 0.05$) (Figura 21). Los títulos de anticuerpos anticitotoxina alcanzados por este grupo en este momento, fueron superiores a los registrados en el grupo inmunizado.

CUADRO 4. ANALISIS DE VARIANZA PARA ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica* EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO EN CORDEROS.

F. de V.	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Nivel de significancia
Tratamientos	3	28.2521	9.4174	4.14	p < 0.025
Alojamiento	1	4.9750	4.9750	2.19	NS
Trat * Aloj	3	6.2573	2.0858	0.92	NS
I (Trat*Aloj)	32	72.7390	2.2731		
Tiempo	7	151.3440	21.6206	27.61	p < 0.005
Trat * Tiem.	21	115.1507	5.4834	7.00	p < 0.005
Aloj * Tiem.	7	3.8812	0.5545	0.71	NS
Error	245	191.8404	0.7830		
Total	319	574.4397			

$r^2 = 66.6$

CUADRO 4a. PROMEDIOS DE MINIMOS CUADRATICOS PARA ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica* EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO EN CORDEROS.

Trat.	Control	S/C	I/D	Citox.
	2.39a	3.07bc	2.78b	3.16c
	± 0.13	± 0.13	± 0.13	± 0.13

p < 0.025

Aloj.	C/CCA	S/CCA
	2.72a	2.97a
	± 0.09	± 0.09

Tiempo Promedio

- 14	2.048 ± 0.18 d
- 7	1.563 ± 0.18 d
- 3	3.425 ± 0.18ab
4	3.765 ± 0.18 a
11	2.733 ± 0.18 c
18	2.813 ± 0.18 c
25	3.125 ± 0.18bc
32	3.323 ± 0.18ab

p < 0.005

S/CAA: Sin cambio a condiciones adversas de alojamiento.
 C/CAA: Con cambio a condiciones adversas de alojamiento.
 S/C: Subcutánea I/D: Intradérmica Citox: Citotóxina.

CUADRO 5. ANALISIS DE VARIANZA PARA ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO EN CORDEROS.

F. de V.	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Nivel de significancia
Tratamientos	3	80.6178	26.8726	5.44	p < 0.005
Alojamiento	1	1.2375	1.2375	0.25	NS
Trat * Aloj	3	12.0688	4.0229	0.81	NS
I (Trat*Aloj)	32	158.0045	4.9376		
Tiempo	7	223.0797	31.8685	33.36	p < 0.005
Trat * Tiem.	21	57.7794	2.7514	2.88	p < 0.005
Aloj * Tiem.	7	9.2292	1.3185	1.38	NS
Error	245	234.0531	0.9553		
Total	319	776.0699			

$r^2 = 69.84$

CUADRO 5a. PROMEDIOS DE MINIMOS CUADRICOS PARA ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO EN CORDEROS.

Trat.	Control	S/C	I/D	Citox.
	4.813a	5.561b	5.861bc	6.163c
	± 0.12	± 0.12	± 0.12	± 0.12

p < 0.005

Aloj.	C/CCA	S/CCA
	5.538a	5.662a
	± 0.08	± 0.08

Tiempo Promedio

- 14	4.360 ± 0.17 a
- 7	4.605 ± 0.17 a
- 3	4.773 ± 0.17 a
4	5.665 ± 0.17 b
11	6.293 ± 0.17 c
18	6.265 ± 0.17 c
25	6.640 ± 0.17 c
32	6.198 ± 0.17 c

p < 0.015

S/CAA: Sin cambio a condiciones adversas de alojamiento.
 C/CAA: Con cambio a condiciones adversas de alojamiento.
 S/C: Subcutánea I/D: Intradérmica Citox: Citotoxina.

CUADRO 6. ANALISIS DE VARIANZA PARA FRECUENCIA RESPIRATORIA DE CORDEROS EN LA EVALUACION DE UN IMMUNOGENO DE Pasteurella haemolytica.

F. de V.	Gl	Suma de cuadrados	F	Nivel de significancia
Tratamientos	3	749.665	0.48	NS
Alojamiento	1	1 524.006	0.03	p < 0.05
Trat * Aloj.	3	462.182	0.67	NS
IDF(Trat * Aloj)	32	9 409.20	-----	
Tiempo	16	9 244.397	0.001	p < 0.001
Trat * Tiempo	48	2 241.885	0.041	NS
Aloj * Tiempo	16	2 416.844	0.001	p < 0.001
Error	560	26 048.179		
TOTAL	679	57 238.347		

CUADRO 7. PROMEDIOS DE MINIMOS CUADRATICOS DEL DAÑO PULMONAR EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO DE *Pasteurella haemolytica*

Trat. Aloj.	Control	S/C	I/D	Citox.	Total
C/CAA	1648.4	814.8	102.2	177.8	685.8 ± 281.79
C/CAA	1892.2	821.4	509.4	258.2	870.4 ± 281.79
Total	1770.3 ^a ± 398.51	818.1 ^{ab} ± 398.51	305.8 ^b ± 398.51	218.2 ^b ± 398.51	778.1 ^b

S/CAA: Sin cambio a condiciones adversas de alojamiento.
 C/CAA: Con cambio a condiciones adversas de alojamiento.
 S/C: Subcutánea I/D: Intradérmica Citox: Citotoxina.
 Distintas literales indican diferencia estadística $p < 0.05$

CUADRO 7a. ANALISIS DE VARIANZA DEL DAÑO PULMONAR EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO DE *Pasteurella haemolytica* EN CORDEROS.

F. de V.	gl	Suma de cuadrados	F	Nivel de significancia
Tratamientos	3	15226161.4	3.20	$p < 0.05$
Alojamiento	1	340771.6	0.21	NS
Trat. * Aloj.	3	238784.6	0.05	NS
Error	32	50818956.0		
Total	39	66624673.6		

Cuadro 8. EVALUACION DEL DAÑO PULMONAR DE ACUERDO A LA MODIFICACION AL CRITERIO DESCRITO POR PANCIERA (74).

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Tamaño de la lesión.	1.8	0.8	0.2	0.3
Lóbulos afectados.	1.9	1.6	1.2	1.3
Edema.	1.4	0.5	0.5	0.3
Pleuritis	1.1	0.2	0.2	0.1
TOTAL ACUMULADO	6.2 ^a	3.1 ^b	2.1 ^b	2.0 ^b

Literales distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

CUADRO 9. GANANCIA DE PESO DIARIA EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO DE *Pasteurella haemolytica* EN CORDEROS.

	Grupo 1 Control	Grupo 2 S/C	Grupo 3 I/D	Grupo 4 Citox.
S/CAA ^a	49.3 ± 4.8	51.0 ± 4.6	50.3 ± 3.8	49.5 ± 4.6
C/CAA ^a	43.1 ± 7.3	46.2 ± 5.6	45.3 ± 3.6	48.0 ± 6.3

S/CAA: Sin cambio a condiciones adversas de alojamiento.

C/CAA: Con cambio a condiciones adversas de alojamiento.

S/C: Subcutánea I/D: Intradérmica Citox: Citotoxina.

Distintas literales indican diferencia estadística p < 0.05

Cuadro 10. TITULOS DE ANTICUERPOS (Log_2) ANTICAPSULA Y ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* EN LA EVALUACION EN CAMPO DE UN IMMUNOGENO EN CORDEROS.

	ANTICAPSULA		ANTICITOTOXINA	
	0	15	0	15
SIN INMUNIZAR	1.10 ^a	1.30 ^a	1.10 ^a	2.40 ^b
INMUNIZADOS	1.30 ^a	3.74 ^b	1.60 ^a	3.24 ^b
ENFERMOS*	2.00 ^a	2.00 ^a	0.00 ^a	4.50 ^b

a,b: Literales diferentes en renglones y tipo de anticuerpos indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

FIGURA TEMPERATURA CORPORAL DE CORDEROS EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO DE *Pasteurella haemolytica* EN CORDEROS. FASE EXPERIMENTAL

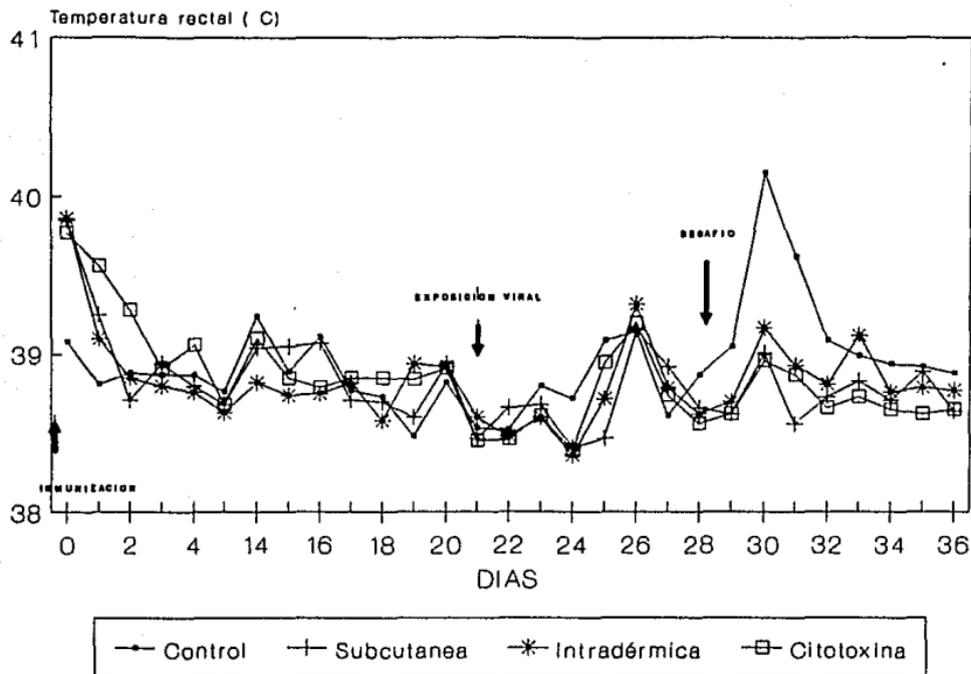


FIGURA 3. ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica* EN CORDEROS. FASE EXPERIMENTAL

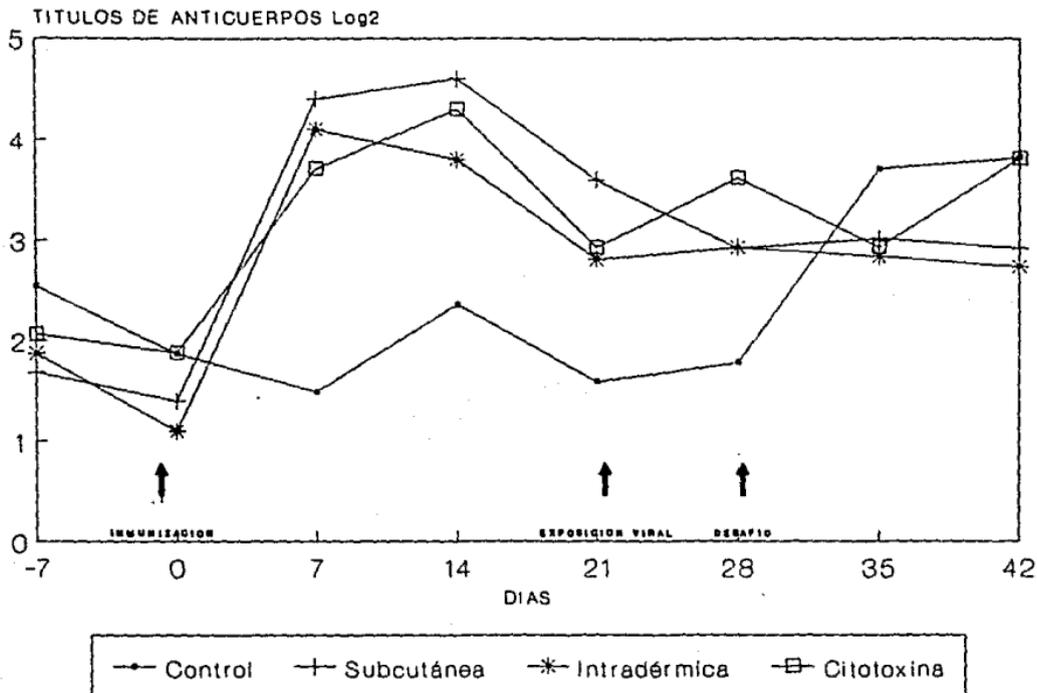


FIGURA 4 . ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica*
EN CORDEROS. FASE EXPERIMENTAL

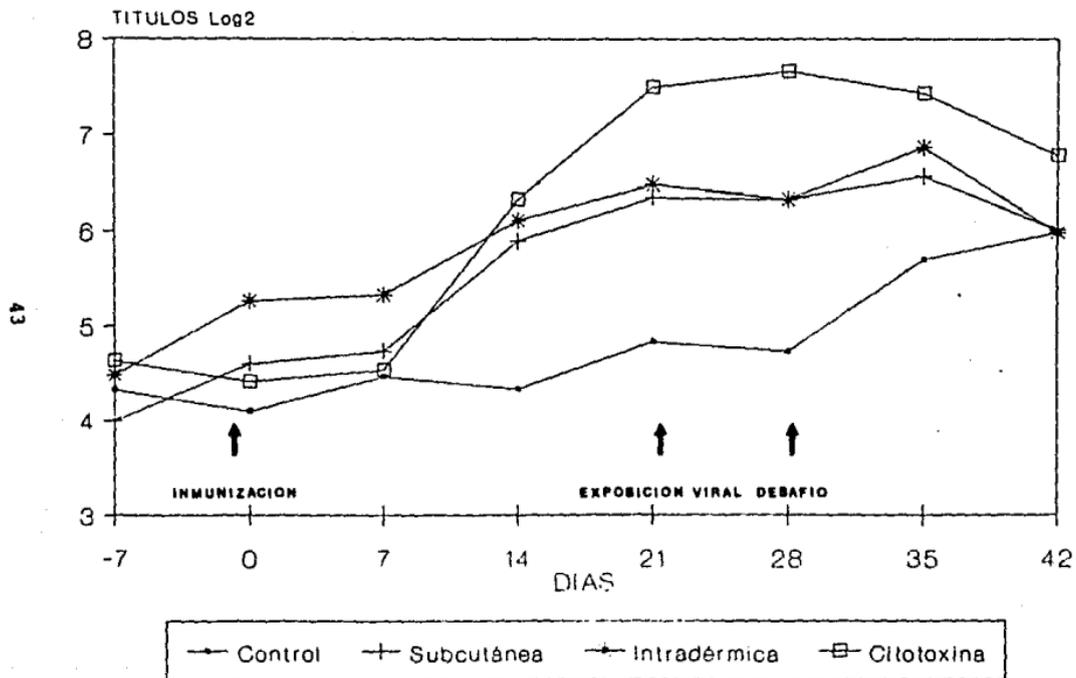


FIGURA 5. FRECUENCIA RESPIRATORIA DE CORDEROS MOSTRANDO EL EFECTO DEL CAMBIO A CONDICIONES ADVERSAS DE ALOJAMIENTO. FASE EXPERIMENTAL

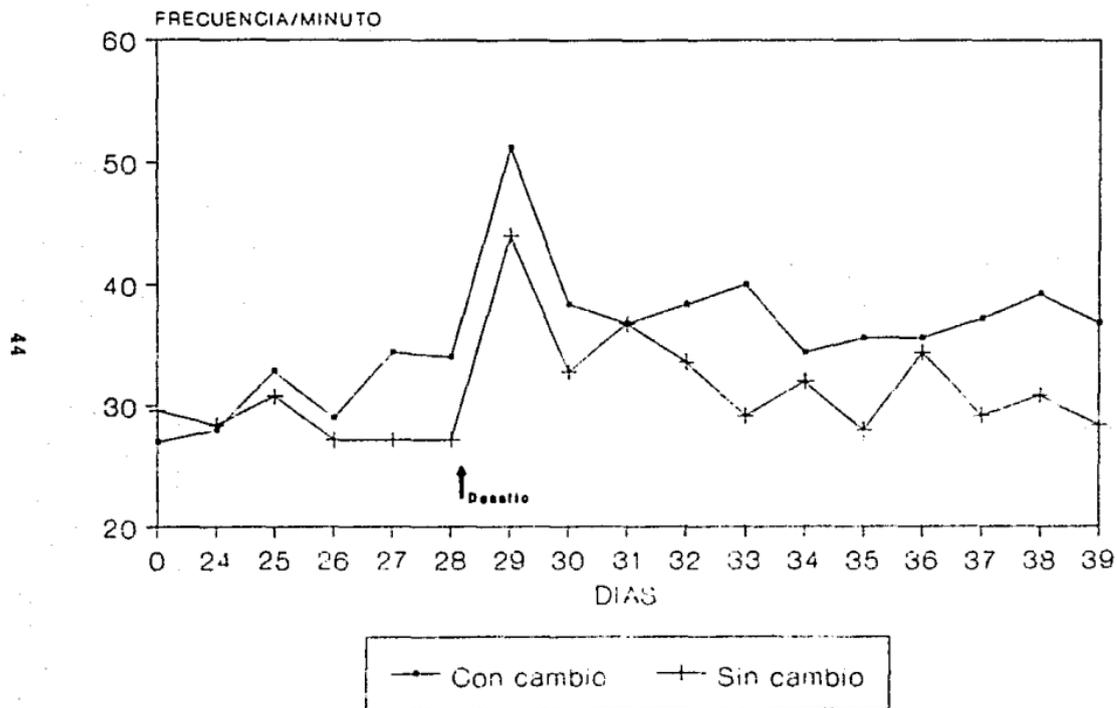
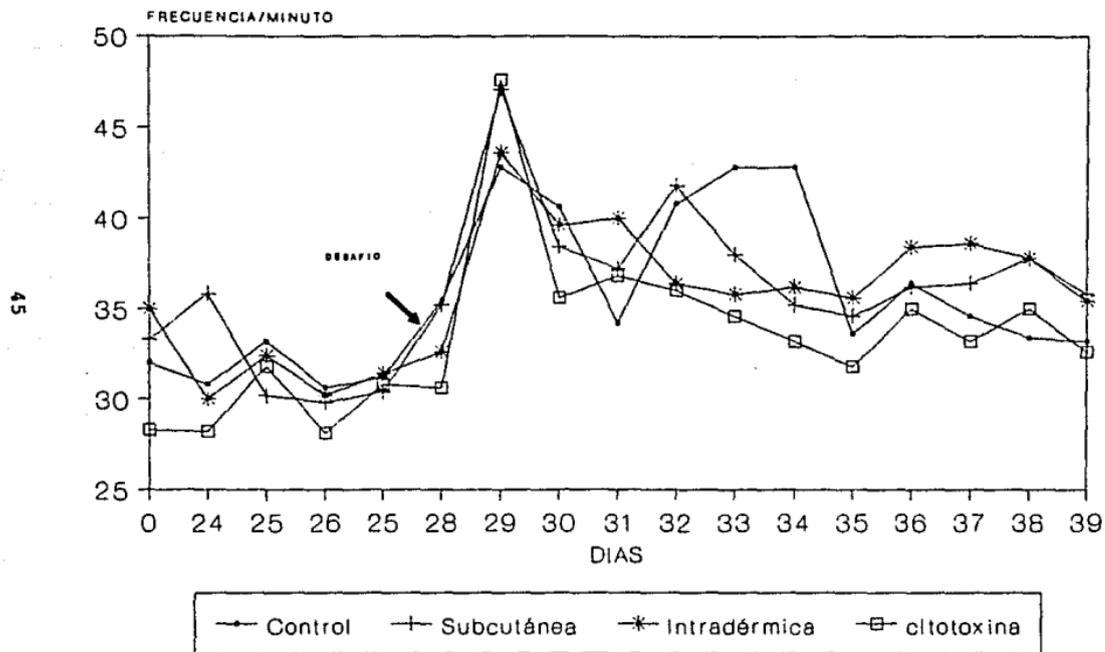


FIGURA 5a. FRECUENCIA RESPIRATORIA DE CORDEROS EN LA EVALUACION DE UN INMUNOGENO DE *Pasteurella haemolytica* EN CORDEROS.



**FIGURA 6. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO CONTROL
FASE EXPERIMENTAL.**

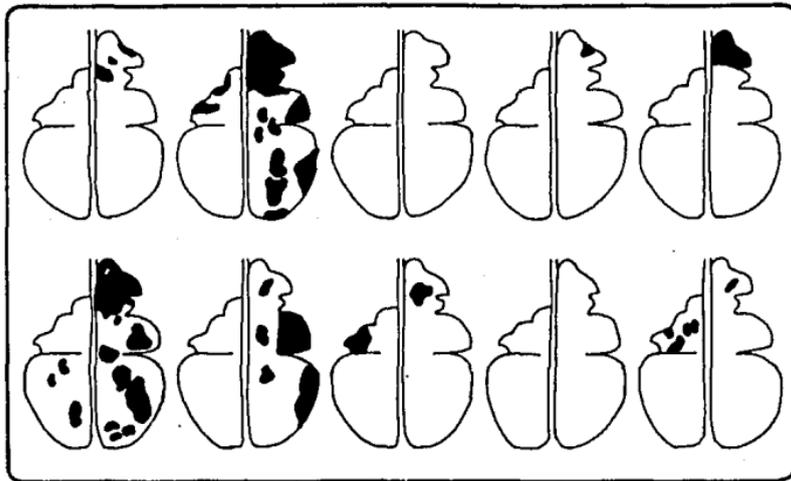


FIGURA 7. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO
INMUNIZADO POR VIA SUBCUTANEA CON *Pasteurella haemolytica*.

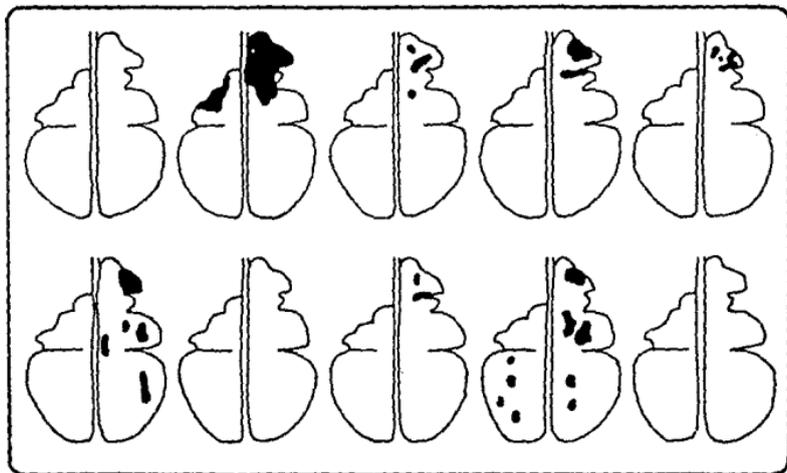
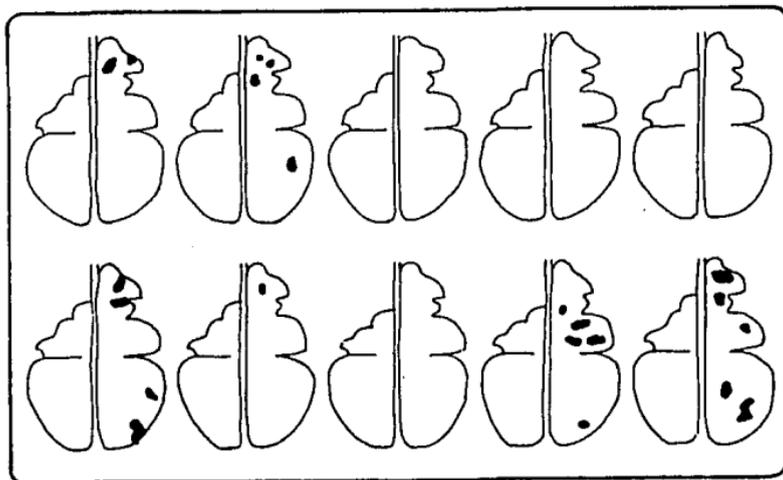


FIGURA 8. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO INMUNIZADO POR VIA INTRADERMICA CON *Pasteurella haemolytica*.



**FIGURA 9. LESIONES PULMONARES EN CORDEROS DEL GRUPO
INMUNIZADO CON CITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* POR VIA SUBCUTANEA**

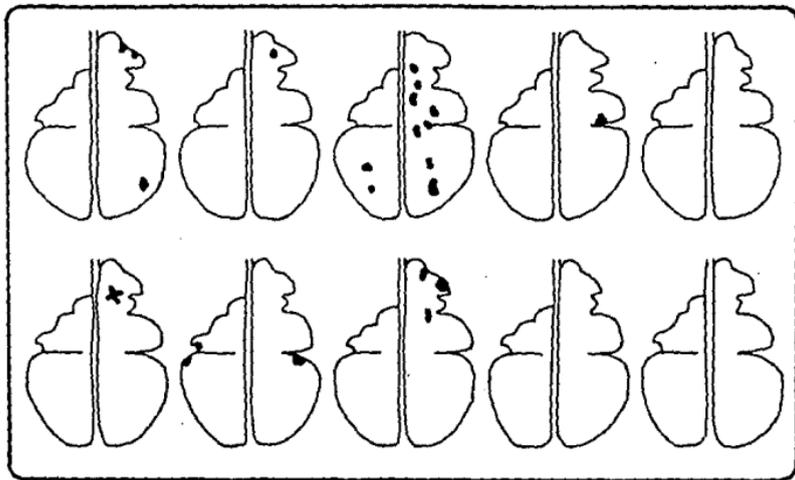
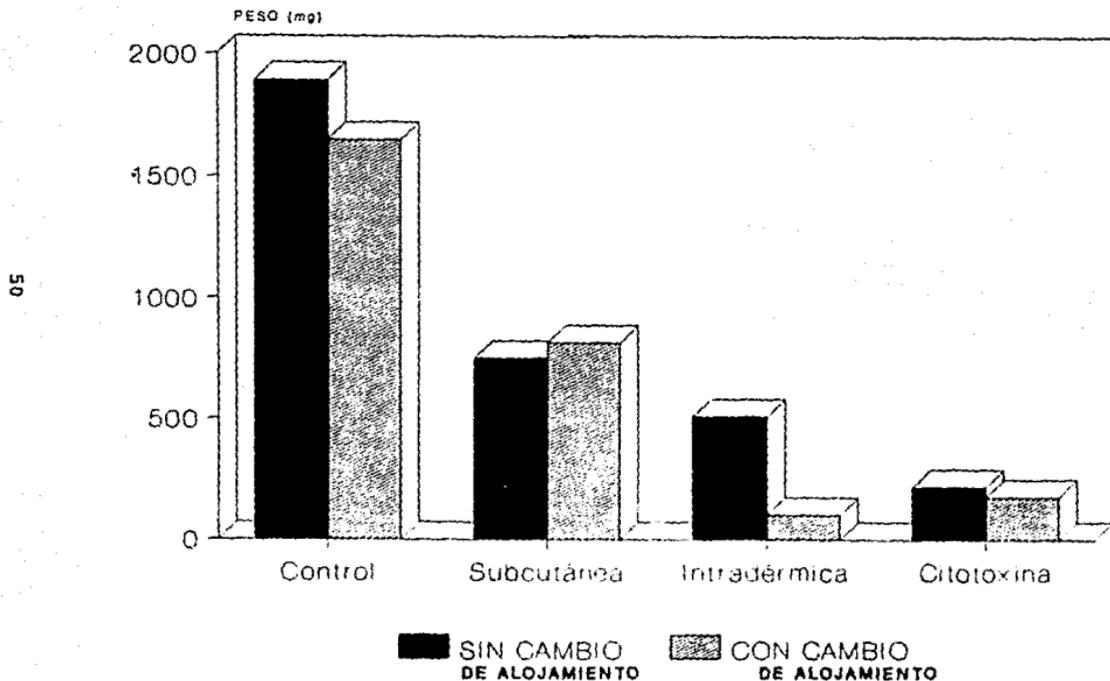


FIGURA 10. EVALUACION DEL DAÑO PULMONAR POR EL PESO DE LAS IMPRESIONES EN PAPEL. FASE EXPERIMENTAL



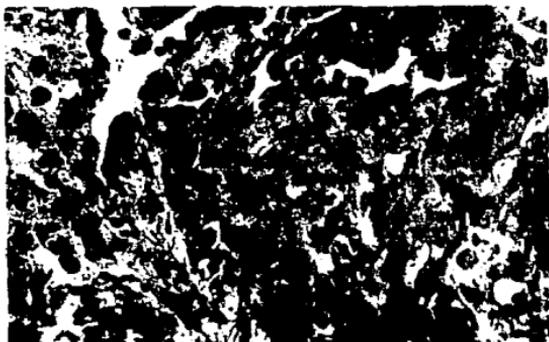


Figura 11. Microfotografía mostrando el patrón fusiforme de macrófagos alveolares en pulmón (600 X).

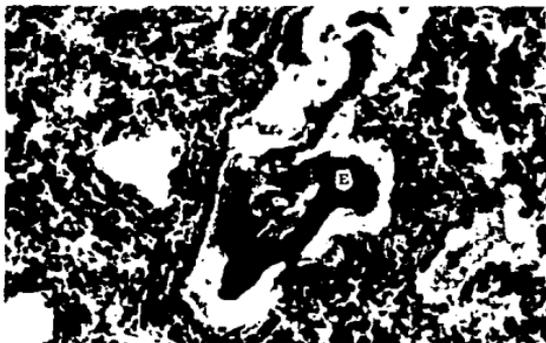


Figura 12. Microfotografía mostrando material amorfo en un bronquiolo (E) e infiltración mononuclear intersticial (150 X)

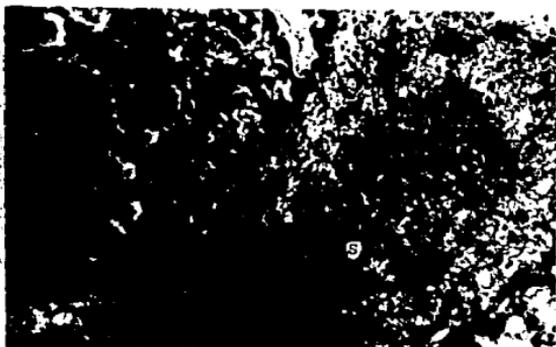


Figura 13. Microfotografía mostrando engrosamiento de septos interlobulillares (S) debido a la presencia de fibrina y células inflamatorias (600 X).



Figura 14. Microfotografía mostrando engrosamiento de pleura (P) debido a la presencia de fibrina y células inflamatorias.

FIGURA 15. FAGOCITOSIS DE *Pasteurella haemolytica* POR MACROFAGOS ALVEOLARES DE CORDEROS SIN UTILIZAR ANTICUERPOS ESPECIFICOS. FASE EXPERIMENTAL

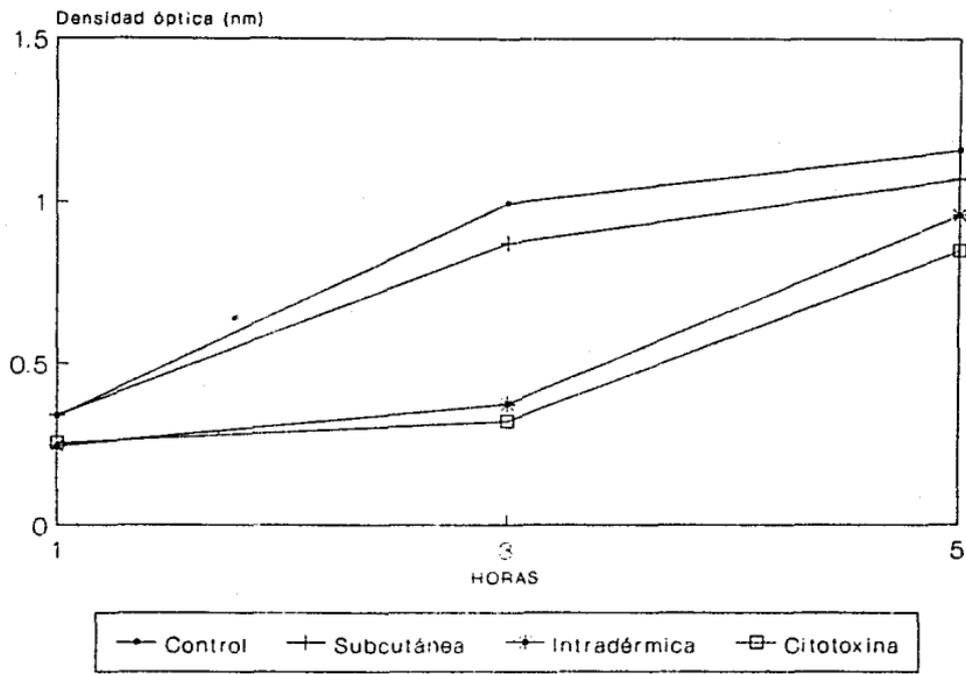


FIGURA 16. FAGOCITOSIS DE *Pasteurella haemolytica* POR MACROFAGOS ALVEOLARES DE CORDEROS UTILIZANDO ANTICUERPOS ESPECIFICOS. FASE EXPERIMENTAL

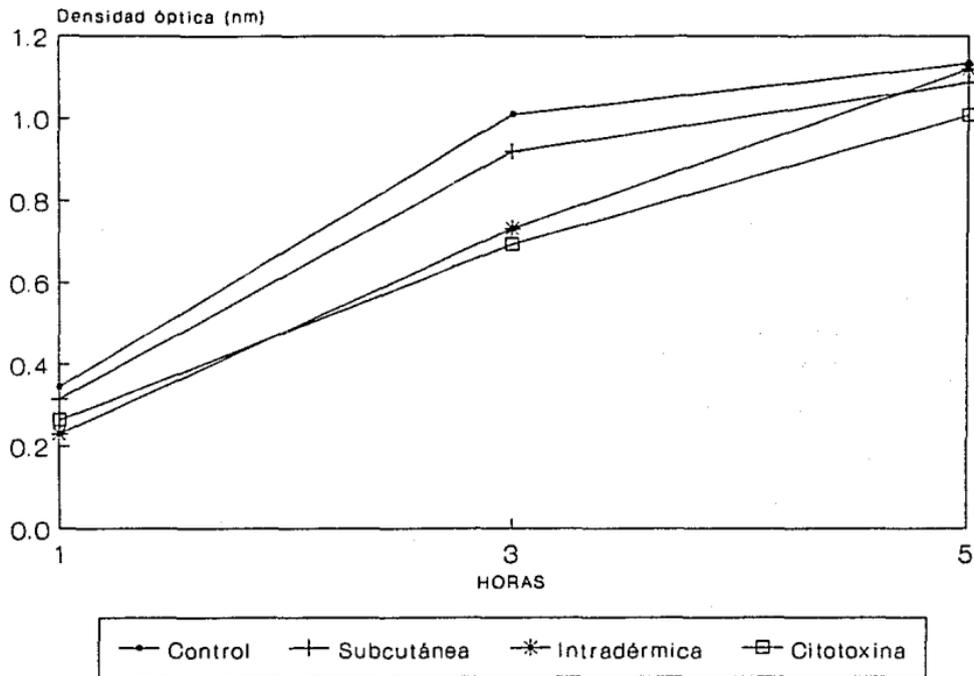


FIGURA 17. EFECTO BACTERICIDA DE *Pasteurella haemolytica* POR MACROFAGOS ALVEOLARES DE CORDEROS. FASE EXPERIMENTAL

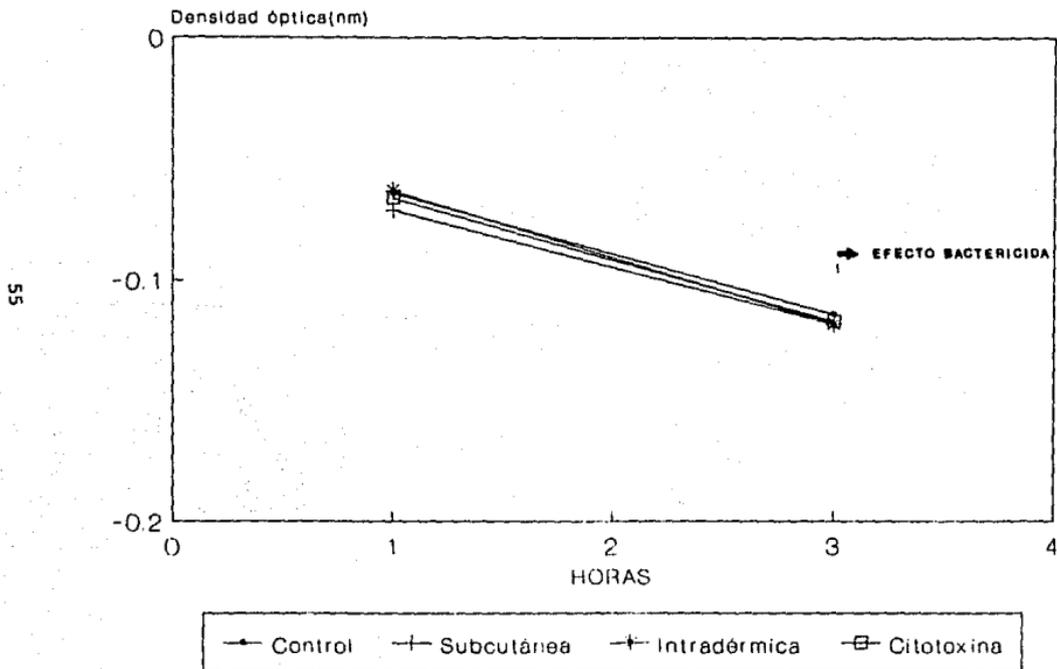
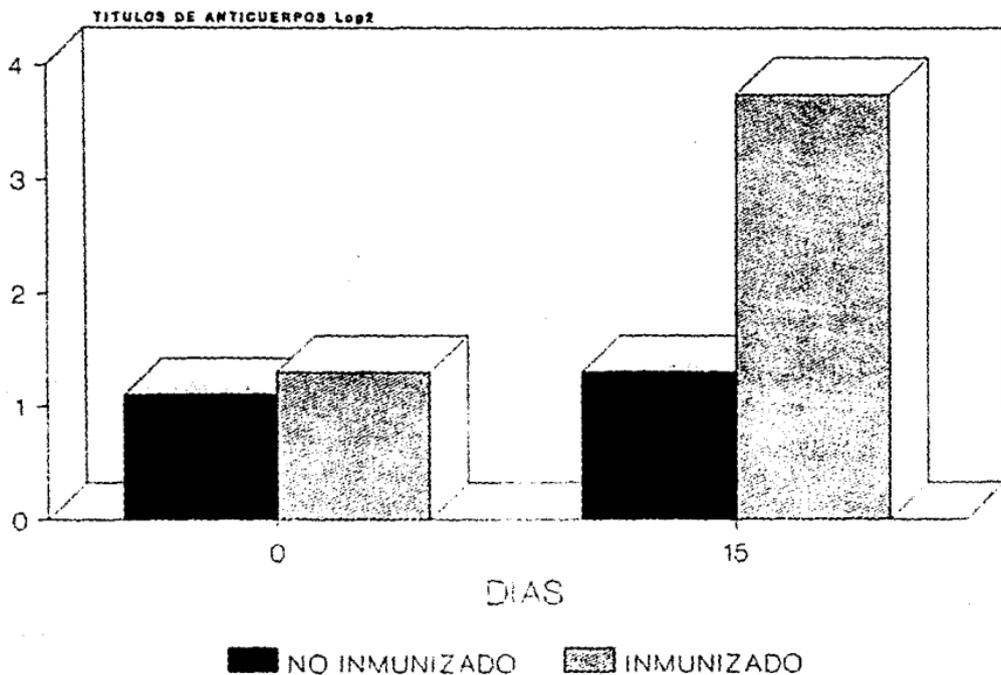


FIGURA 18. ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica*
EN CORDEROS. FASE DE CAMPO



**FIGURA 19. ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica*
EN CORDEROS. FASE DE CAMPO**
TITULOS DE ANTICUERPOS Log₂

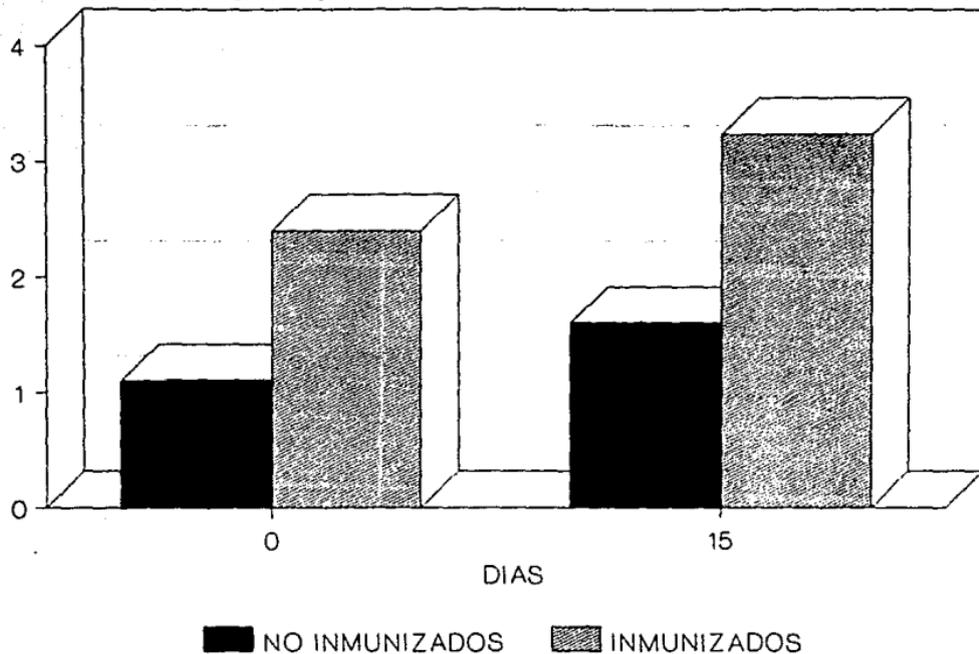


FIGURA 20. ANTICUERPOS ANTICAPSULA Y ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* EN CORDEROS. FASE DE CAMPO

TITULOS DE ANTICUERPOS Log₂

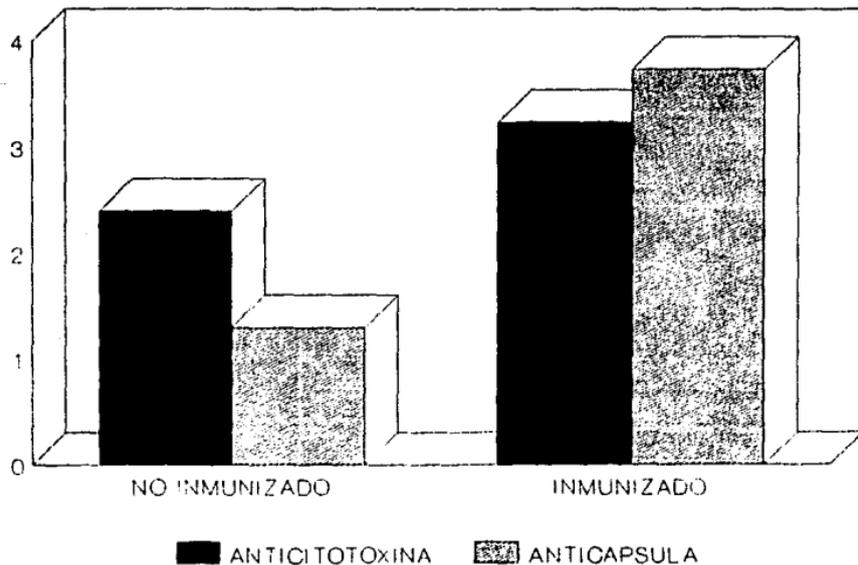
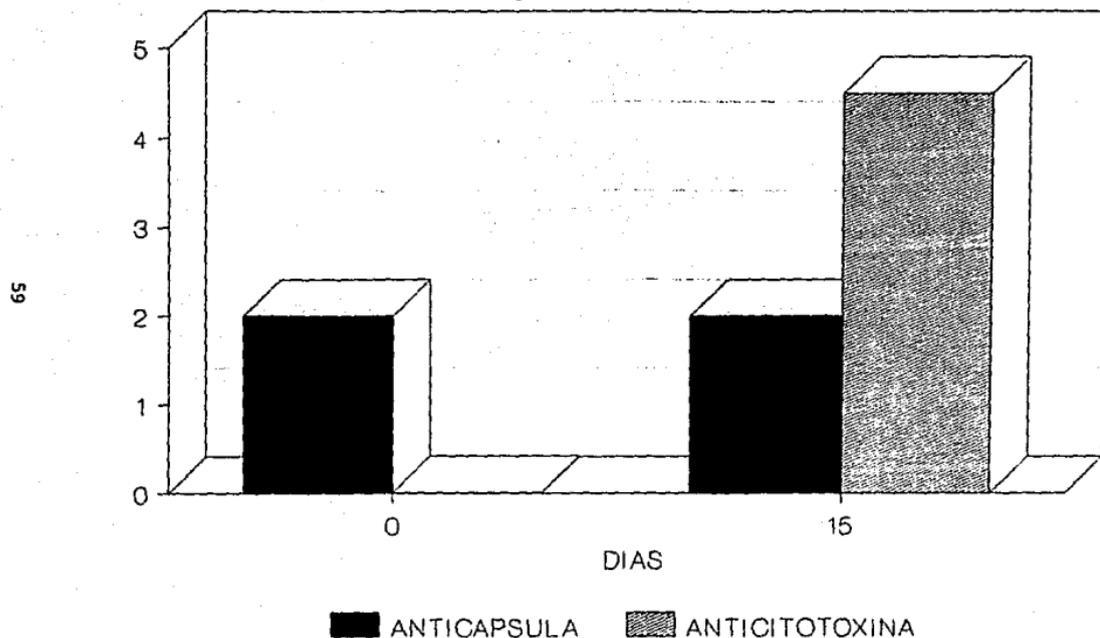


FIGURA 21. ANTICUERPOS ANTICAPSULA Y ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* EN ANIMALES ENFERMOS. FASE DE CAMPO

TITULOS DE ANTICUERPOS Log₂



DISCUSION:

La respuesta clínica más evidente a la inmunización en los animales, fue el aumento de temperatura. El comportamiento de esta variable puede ser considerada como normal, debido a que se ha demostrado que la aplicación de ciertos inmunógenos desencadena reacciones postvacunales que se caracterizan básicamente por el aumento de temperatura (24, 53, 80). Es importante señalar que este aumento no alcanzó valores considerados como febriles. Los inmunógenos utilizados en este trabajo fueron capaces de reducir en forma notoria la elevación de temperatura subsecuente al desafío con P. haemolytica, lo que puede indicar cierto grado de protección al daño ocasionado por esta bacteria; resultados similares utilizando otros antígenos han sido descritos en otros trabajos (47, 103). Sin embargo, en estudios realizados por otros autores (9), se observa incremento de temperatura después del desafío en animales vacunados a pesar de observarse buena protección al daño pulmonar.

A pesar de que no existieron diferencias significativas entre inmunógenos, debido a variabilidad alta de los resultados obtenidos, las lesiones menos severas fueron observadas en el grupo inoculado con la citotoxina más ACF. En un trabajo realizado por Jericho (48) se observó una protección aceptable al inocular un sobrenadante de cultivo preparado de forma similar al utilizado en el presente trabajo. Sin embargo, en el trabajo de Jericho el sobrenadante fue inoculado en forma combinada con P. haemolytica inactivada con formalina sin el uso de adyuvantes.

El efecto protector observado, quizás no se debe a la citotoxina de P. haemolytica exclusivamente, ya que en el sobrenadante

utilizado, por su proceso de elaboración, están contenidos otros antígenos solubles que podrían estar jugando un papel importante en la protección conferida a los animales. Entre estos antígenos se encuentran extractos solubles capsulares, la citotoxina y otros productos del metabolismo de la bacteria (81, 86, 89). En la actualidad la mayoría de los trabajos de investigación destacan la importancia de la citotoxina de *P. haemolytica*, ya que se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra este compuesto, reduce en forma notoria el daño pulmonar al desafío. Por otro lado, los títulos bajos contra la leucotoxina se traducen como baja resistencia al daño pulmonar (15, 35, 68, 87). Es necesario destacar que en algunos trabajos, se ha observado cierto grado de protección con el uso de bacterinas y otros extractos, lo que sugiere que otros antígenos aparte de la citotoxina pueden ser importantes en conferir protección contra la pasteurelisis neumónica (25). A pesar de esto, la mayor parte de los estudios donde se evalúan las bacterinas, estas confieren escasa protección y en algunos casos acentúan el daño pulmonar al desafío (25, 32, 100).

La vacunación con bacterias vivas por diversas vías, también ha demostrado su eficacia al desafío con *P. haemolytica* y aún contra la exposición viral y desafío bacteriano en forma combinada. Las mejores vías han sido, en orden de eficiencia, la aerolizada, intradérmica, subcutánea y la intramuscular (14, 21, 51, 74). En el presente trabajo se observa un comportamiento similar para la vía intradérmica y subcutánea sin existir diferencia significativa entre ambas vías.

Los métodos utilizados para evaluación de daño pulmonar se observaron resultados similares por lo que el método de impresión y pesaje en papel podría empezar a considerarse en trabajos subsecuentes por ser fácil de realizar, de bajo costo y por dar valores para su análisis cuantitativo.

Los títulos de anticuerpos anticápsula altos no siempre han sido sinónimo de protección. En algunos trabajos (32, 100), se ha observado este fenómeno. En este aspecto cabe señalar que los mecanismos inmunes contra *P. haemolytica* son complejos e incluyen entre otros, La inmunidad mediada por células donde se involucran los linfocitos T, que pueden ser directamente tóxicos a las bacterias o pueden favorecer el efecto bactericida por parte de los macrófagos por la activación de los mismos, este es uno de los principales mecanismos contra la bacteria (58,101). El segundo mecanismo está dado por la presencia de IgA en secreciones que impide la multiplicación y colonización de la bacteria en las mucosas (15, 59, 97). El tercer mecanismo es la opsonización por anticuerpos específicos conferida por IgG, IgM e IgE las cuales pueden estar en concentraciones altas en los alveolos, dado que la bacteria induce permeabilidad vascular, favoreciéndose así la fagocitosis y destrucción de la bacteria por las células fagocíticas (36, 85, 97, 99). Otro mecanismo importante es del complemento que se da a nivel sérico y local (101). El último mecanismo de importancia es la presencia de anticuerpos neutralizantes de la citotoxina en suero y secreciones bronquialveolares, lo que confiere cierta protección a las células fagocíticas. (15, 85, 101). En este trabajo se observó una

relación directa con los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de P. haemolytica con el grado de protección conferida por los diferentes inmunógenos. La vía intradérmica podría ser considerada la mejor, a pesar de no existir diferencia significativa con respecto a la vía subcutánea, sin embargo, no fue posible evaluar otros mecanismos de inmunidad que pudiesen poner de manifiesto la inmunidad celular, que teóricamente es inducida por esta vía y es la más efectiva de acuerdo a lo anteriormente expuesto.

La evaluación de fagocitosis en este trabajo reveló una mejor fagocitosis a las 3 horas para los grupos inoculados con citotoxina y por vía intradérmica. Para el caso de la vía intradérmica esto puede explicarse por la posible presencia, en los lavados, de macrófagos sensibilizados con aumento de receptores de membrana para la fracción C de IgG (94), aunado a la activación de los mismos por linfocitos T. Sin embargo, para el caso del grupo inoculado con citotoxina, el comportamiento de los macrófagos in vitro es más difícil de explicar. Lo que podría haber sucedido es que al estar aplicando un antígeno crudo, la posible presencia de otros antígenos solubles, haya estimulado al sistema inmune humoral y celular con la subsecuente sensibilización y activación de macrófagos hacia estos antígenos. El comportamiento observado para los macrófagos provenientes del grupo inmunizado por vía subcutánea, en los cuales la fagocitosis fue ineficiente, puede deberse a que la fagocitosis se llevó a cabo en forma eficiente en la primera hora de incubación, pero la falta o escasa activación de los macrófagos por parte de linfocitos in vivo para acelerar la bacteriolisis, favoreció la

producción de citotoxina por parte de la bacteria con la subsecuente destrucción del macrófago. Al transcurrir el período de incubación, el daño ocasionado al macrófago permitió la proliferación de la bacteria, debido a esto las lecturas hechas a las 3 horas de incubación se traducen en una fagocitosis inefectiva. Un comportamiento similar se observa en todos los grupos al adicionar al medio suero de ovino con anticuerpos específicos y quizá otros factores solubles en el suero contra P. haemolytica, por lo que hubiese sido necesario hacer evaluaciones a intervalos más cortos para observar este posible efecto. Otro factor que pudiera estar involucrado es la relación bacteria-macrófago, ya que el método utilizado para el conteo de bacterias es muy inexacto, aunque similar para todos los grupos; lo que pudo provocar que la relación fuera inadecuada. Se ha determinado en otros trabajos que la relación adecuada es de 100 bacterias opsonizadas por macrófago; relaciones mayores conllevan a muerte celular por la posible acción de la leucotoxina (59).

Las condiciones de alojamiento, con lo que se trató de someter a los animales a un estrés por hacinamiento e irritación por el acúmulo de excretas y orina, no tuvo el efecto deseado ya que no hubo diferencias en las variables estudiadas, excepto para la de frecuencia respiratoria que invariablemente se mostró aumentada. Es probable que el efecto deseado no se haya alcanzado debido a que no fue suficiente el hacinamiento y la irritación causada para mantener en estrés constante a los animales y no se contaba con un método para evaluar el grado de estrés de los mismos. Un método que se ha usado recientemente para la evaluación cuantitativa del

estrés es la determinación de cortisol plasmático (30). Existen estudios donde se demuestra el efecto de factores estresantes sobre la presentación de neumonía. Por ejemplo en un estudio realizado con bovinos se demostró el efecto negativo del frío sobre la funcionalidad del pulmón y el daño pulmonar ocasionado por *P. haemolytica* (88). Por otra parte, en un estudio realizado por Jones (49) se observó que el cambio brusco de temperatura y humedad relativa no tuvo efecto en el grado de remoción bacteriana en vías respiratorias.

Con relación a la ganancia de peso existen resultados contradictorios sobre el efecto de la vacunación sobre esta variable; por ejemplo Confer (20) y Purdy (79) en dos trabajos de campo observaron que no hubo efecto al vacunar bovinos por vía intradérmica con *P. haemolytica* viva, sobre las variables ganancia de peso, consumo y conversión alimenticia. En tanto en otros trabajos si se observó un efecto benéfico a la vacunación con la subsecuente mejora de la relación costo-beneficio (41, 50). Como ya se mencionó, en el presente trabajo no se observó efecto sobre la variable ganancia de peso a la vacunación, pero se debe tomar en cuenta que los animales fueron alimentados con una dieta de mantenimiento que les impidió desarrollar en forma óptima este parámetro.

El hecho de haber realizado únicamente el aislamiento de la cepa de desafío en un sólo animal puede deberse a que los intentos de aislamiento se realizaron hasta el sacrificio de los animales. En este momento habían transcurrido 10 días desde que se realizó el desafío bacteriano, tiempo suficiente para haberse llevado a cabo

la remoción y destrucción de la bacteria por parte de los mecanismos inmunológicos del animal. Como ya se mencionó, en términos generales las lesiones producidas por el desafío en el presente trabajo fueron de moderadas a leves, esto se puede asociar al fracaso en la recuperación de P. haemolytica. Existen trabajos donde se ha evaluado el grado de remoción bacteriana tomando en consideración numerosas variables. En la mayoría de estos trabajos se observa que los periodos de remoción son muy cortos (horas) y los periodos más largos corresponden a estudios donde se somete a los animales a factores que comprometen su respuesta inmunológica (12, 39, 56, 62, 71, 72, 82). En otros trabajos donde se ha intentado la recuperación de la cepa de desafío de P. haemolytica se ha logrado el aislamiento en menos del 20 % de los casos de animales que han sobrevivido al desafío, este porcentaje se eleva considerablemente cuando se ha intentado el aislamiento de animales muertos por neumonía (13, 51, 53).

Por último, el modelo utilizado en este trabajo, fue similar a los que comúnmente se utilizan para la evaluación de inmunógenos de P. haemolytica por diversos autores. En bovinos, por ejemplo, se ha utilizado la exposición con el virus herpes bovino tipo 1 y desafío bacteriano por diversas vías 3 a 5 días después; sin embargo, el principal problema que han tenido es que la cepa viral comúnmente desarrolla el complejo respiratorio por sí mismo haciendo difícil la interpretación de resultados (14, 46). Por otra parte, el virus de PI3 es más inocuo comparado con el herpesvirus bovino tipo 1, pero a pesar de que no afecta la clarificación de bacterias en el tracto respiratorio, es capaz de

aumentar la susceptibilidad al desafío por alteraciones causadas a los macrófagos (47).

Con respecto a la fase de campo, el inmunógeno evaluado mostró cierto grado de inocuidad, debido a la ausencia de reacciones clínicas postvacunales. Es importante señalar que el año en que se llevó a cabo la evaluación del inmunógeno (1990) fue considerado por algunos clínicos de la zona (73) como muy benéfico, dada la escasa mortalidad que se presentó en la mayoría de los rebaños. Esta aseveración se apoya también en otros estudios colaterales sobre mortalidad en corderos (resultados aún sin publicar), que se estuvieron realizando en la zona, donde se observó también baja mortalidad en los rebaños evaluados (69). A esto se atribuye la escasa presentación de cuadros neumónicos y mortalidad en las explotaciones donde se evaluó el inmunógeno. En un trabajo realizado por Pedroso (76) en terneros, donde se evaluó un inmunógeno de P. multocida a nivel campo, utilizaron 254 animales de los que sólo enfermaron de neumonía el 8 %.

Los animales que presentaron neumonía clínica en el presente trabajo, como ya se mencionó, pertenecían a un sólo rebaño. Sin dejar de ser una simple apreciación difícil de cuantificar científicamente por el número de explotaciones evaluadas, el rebaño donde se presentaron los cuadros de neumonía clínica, era la que mayor grado de hacinamiento mostraba (1.2 animales por metro cuadrado) y mostraba el clásico manejo de la zona de pastoreo diurno con encierro nocturno de traspatio en instalaciones parcialmente techadas. Las otras 4 explotaciones llevaban a cabo el otro sistema de la zona de pastoreo diurno con

encierro nocturno en el monte en instalaciones rústicas, sin techo y con cierto grado de hacinamiento (aproximadamente 1.5 animales por metro cuadrado). En un trabajo realizado en México por Aguilar y Tórtora (1), en el que se evaluaron un número mayor de explotaciones en la misma zona, se observó un comportamiento similar, donde los problemas respiratorios se presentaron con menor frecuencia en explotaciones en las que se llevaba a cabo el pastoreo diurno con encierro nocturno en el monte sin techo.

Los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina tuvieron un respuesta similar al presentado en la fase experimental, sin embargo, debido a la escasa incidencia de neumonías y nula mortalidad, fue imposible correlacionar el título de anticuerpos con grado de protección. Un detalle interesante fue la ausencia de anticuerpos anticitotoxina en animales que presentaron neumonía clínica al momento de ser detectada, este hecho apoya en primer lugar la teoría de que la neumonía era causada por P. haemolytica y en segundo lugar la importancia que puede estar jugando la citotoxina en la patogénesis de la enfermedad. Como ya se mencionó, los títulos de anticuerpos anticitotoxina están directamente correlacionados con el grado de protección en la pasteurelosis neumónica de los animales (15, 35, 68, 87).

En México, a pesar de todos estos estudios, el uso de bacterinas se realiza en forma rutinaria en explotaciones comerciales de ovinos y bovinos. Afortunadamente en forma experimental, ya se han realizado los primeros esfuerzos por evaluar otro tipo de inmunógenos, donde destacan el uso de bacterias vivas y de sobrenadantes de cultivo para conferir protección a los animales con resultados aparentemente satisfactorios (43, 44, 78).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES:

Los inmunógenos utilizados en la fase experimental y de campo fueron inocuos para los animales, basado en la ausencia de reacciones postvacunales de consideración.

Se observó una relación directa entre títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina con el grado de protección al desafío experimental y natural con P. haemolytica.

La inmunización disminuyó el daño pulmonar al desafío experimental con P. haemolytica, así como las manifestaciones clínicas en los animales.

De acuerdo a los resultados de fagocitosis, la inmunidad celular podría estar jugando un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

La citotoxina de P. haemolytica participa de manera determinante en la patogénesis de la enfermedad. Este argumento se basa en la relación encontrada entre títulos de anticuerpos y grado de protección; en la ausencia de anticuerpos contra esta leucotoxina en animales enfermos y por ser el inmunógeno que redujo en forma más notoria la presentación del daño pulmonar al desafío.

LITERATURA CITADA

- 1.- Aguilar, T.C. y Tórtora, P.J., 1989. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F., Memoria del II Congreso Nacional de Producción Ovina, p.146.
- 2.- Aley, M.R. y Clarke, J.L., 1977. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. N. Z. Vet. J., 25: 200.
- 3.- Argueta, G.J., 1986, Frecuencia de Pasteurella haemolytica en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, México D.F.
- 4.- Ayala, A.D., 1988. Evaluación de fagocitosis, efecto bactericida y citotoxicidad de Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida en macrófagos alveolares de bovinos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 5.- Ayala, M.A., 1977, Incidencia y prevalencia de neumonías en becerros Holstein Friesian en etapa de lactancia y destete durante un año en un centro de recría. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, México D.F.
- 6.- Benjamin, M.M., 1974, Outline of Veterinary Clinical Pathology. 2da.ed., The Iowa state University Press. Iowa, USA, p 43.
- 7.- Berggren, K.A., Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Bemrick, W.J. y Maheswaran, S.K., 1981. Cytotoxic effect of Pasteurella haemolytica on ovine neutrophils. Am. J. Vet. Res., 42: 1383.
- 8.- Biberstein, E.L., 1978. Biotyping and serotyping of Pasteurella haemolytica. En: Bergan, T. y Norris, J., Methods in Microbiology. New York Academic Press Inc., 10: 253.
- 9.- Blanchard-Channell, M.T., Ashfaq, M.K. y Kadel, W.L., 1987. Efficacy of a streptomycin-dependent, live Pasteurella haemolytica vaccine against challenge exposure to Pasteurella haemolytica in cattle. Am. J. Vet. Res., 48:637.
- 10.- Blanco, V.F.J., 1990. Serotipos de Pasteurella multocida y Pasteurella haemolytica aislados a partir de pulmones con lesiones neumónicas en ruminantes domésticos. Tesis de maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México.
- 11.- Blood, D.C., Henderson, J.A. y Rodostits, O.M., 1981. Veterinary Medicine. 5th ed. Bailliere, Tindall and Cassell, London. p.360.

- 12.- Briggs, R.E., Kehrl, M. y Frank, G.H., 1988. Effects of infection with parainfluenza-3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus on neutrophil functions in calves. Am. J. Vet. Res., 49:682.
- 13.- Buddle, B.M., Pfeffer, A., Cole, D.J.W., Pulford, H.D. y Ralston, M.J., 1990. Experimental respiratory infection of goats caprine herpesvirus and Pasteurella haemolytica. N. Z. Vet. J., 38:22.
- 14.- Cardella, M.A., Adviento, M.A. y Nerving, R.M., 1987. Vaccination studies against bovine Pasteurella pneumonia. Can. J. Vet. Res., 51:204.
- 15.- Cho, H.J., Bohac, J.C., Yates, W.D.G., y Ohmann, H.B., 1984. Anticytotoxin activity of bovine sera and body fluids against Pasteurella haemolytica A1 cytotoxin. Can. J. Comp. Med., 48:151.
- 16.- Ciprian, C.A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tórtora, J., Colmenares, G., López-Revilla, R., De la Garza, M., 1988. Mycoplasma hyopneumoniae increases the susceptibility of pigs to experimental Pasteurella multocida pneumonia. Can. J. Vet. Res. 52: 434.
- 17.- Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A. y Confer, A.D. 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by Pasteurella haemolytica leucotoxin. Infect. Immun., 57:420
- 18.- Colin, R., Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Trigo, T.F.J. y Merino, M.M., 1987. Serotipos de Pasteurella haemolytica en pulmones neumónicos de ovinos en México. Rev. Lat-Amér. Microbiol. 29:231.
- 19.- Colmenares, V.G.R., 1990. Evaluación de la inmunidad conferida por extractos proteicos de Haemophilus pleuropneumoniae mediante desafío experimental. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 20.- Confer, A. W., Wright, J. C. y Cummins, J. M., 1983. Use of a fluorometric immunoassay to determine antibody response to Pasteurella haemolytica in vaccinated and nonvaccinated feedlot cattle. J. Clin Microbiol., 18:866.
- 21.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Corsvet, R.E., Rummage, J.A., y Fulton, R.W., 1984. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of Pasteurella haemolytica used as a live vaccine. Am. J. Vet. Res., 45: 2543.
- 22.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Fulton, R.W., Gentry, M.J. y Rummage, J.A., 1985. Effect of vaccination with live or killed Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res., 46: 342. *

- 23.- Confer, A.W., Panciera, R.J. y Mosier, D.A., 1985. Immunity to Pasteurella haemolytica. J.A.V.M.A., 193:1308.
- 24.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. y 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.
- 25.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. y Fulton, R.W., 1987. Immunologic response to Pasteurella haemolytica and resistance against experimental bovine pneumonic pasteurellosis, induced by bacterins in oil adjuvants. Am. J. Vet. Res., 48:163.
- 26.- Davies, D.H., Dungworth, D.L., Humpreys, S. y Johnson, A.J., 1977. Concurrent infection of lambs with parainfluenza virus type 3 and Pasteurella haemolytica. N. Z. Vet. J., 25: 263.
- 27.- Davies, D.H., y Penwarden Rosemary, A., 1981. The phagocytic cell responses of the ovine lung to Pasteurella haemolytica. Vet. Microbiol., 6: 183.
- 28.- Dereck, A.M., Simons, K.R., Confer, A.W., Panciera, R.J. y Clinkenbeard, K.D., 1989. Pasteurella haemolytica antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infect. Immun., 572:711.
- 29.- Durham, J.A., y Confer, A.W., 1986. Comparison of the antigens associated with saline solution, potassium thiocyanate, and sodium salicylate extracts. Vet. Res., 47: 1946.
- 30.- Filion, L. G., Gilson, P. G., Bielefeldt-Ohomann, H., 1984. The possible role of stress in the induction of pneumonic pasteurellosis, Can. J. Comp. Med., 48:268-274.
- 31.- Frank, G.H. y Wessman, G.E., 1978. Rapid plate agglutination procedure for serotyping Pasteurella haemolytica. J. Clin. Microbiol., 7: 142.
- 32.- Friend, S.C.E., Wilkie, B.N., Thomson, R.G. y Barnum, D.A., 1977. Bovine pneumonic pasteurellosis: Experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. Can. J. Comp. Med., 41:77.
- 33.- Gentry, M.L., y Richard, E., 1981. Extraction of capsular material from Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res., 43: 2070.
- 34.- Gentry, M.L., Confer, A.W., y Kreps, J.A., 1985. Simple visual assay for determination of Pasteurella haemolytica cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. J. Clin. Microbiol., 22: 968.
- 35.- Gentry, M.L., Confer, A.W. y Panciera, R.J., 1985. Serum neutralization of cytotoxin from Pasteurella haemolytica serotype 1 and resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Vet. Immunol. Immunopathol., 9:239.

- 36.- Gershwin, L.J., y Frieberts, H.K., 1987. Demonstration of Pasteurella haemolytica specific immunoglobulin E in bovine serum. Am. J. Vet. Res., 48: 169.
- 37.- Gilmour, N.J.L., Thompson, D.A., y Fraser, J., 1974. The recovery of Pasteurella haemolytica from the tonsils of adult sheep. Res. Vet. Sci., 17: 41.
- 38.- Green, G.M., 1971. In defense of the lung. Am. Rev. Resp. Dis., 102:691.
- 39.- Green, G.M., Jakab, G.J., Low, R.B. y Davis, G.S., 1977. Defense mechanisms of the respiratory membrane. Am. Rev. Resp. Dis., 102:691.
- 40.- Handy, A.H., y Trapp, A.L., 1967. Investigation of nasal microflora of feedlot calves before and after weaning. Am. J. Vet. Res., 28: 1019.
- 41.- Henry, C.W., 1984. Shipping fever pneumonia. A new look at an old enemy. Vet. Med., 79:1200.
- 42.- Himmel, M.E., Yates, M.D., Laverman, L.R. y Squire, P.G., 1982. Purification and partial characterization of a macrophage citotoxin from Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res., 43: 764.
- 43.- Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Vázquez, N.J., Trigo, T.F. y Suárez, G.F. 1991. Evaluación de la inmunidad pasiva contra Pasteurella haemolytica A-1 en corderos provenientes de borregas inoculadas con diferentes antígenos bacterianos. Memorias de la XVI congreso Nacional de Buiatría. México. p.351.
- 44.- Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Trigo, T.F., Suárez, G.F. y Vázquez, N.J., 1991. Desafío experimental de ovinos inmunizados con vacuna y sobrenadante de cultivo (leucotoxina) de Pasteurella haemolytica. Memorias del XVI Congreso Nacional de Buiatría. México. p.354.
- 45.- Jenney, E.W. y Snyder, B.A., 1981. Serologic microtitration techniques. Department of Agriculture Animal and Plant health. USA. 37.
- 46.- Jericho, K.W.F., Magwood, S.E. y Stockdale, P.H.G., 1976. Prevention of experimental bovine pneumonic pasteurellosis by exposure to IBR virus. Can. Vet. J., 17:194.
- 47.- Jericho, K.W.F., Darcel, C.Q. y Langford, E.V., 1982. Respiratory disease in calves produced with aerosols of parainfluenza-3 virus and Pasteurella haemolytica. Can. J. Comp. Med., 46:293.
- 48.- Jericho, K.W.F., Cho, H.J. y Kozub, G.C., 1990. Protective effect of inactivated Pasteurella haemolytica bacterin challenged in bovine herpesvirus-1 experimentally infected calves. Vaccine, 8:315.

- 49.- Jones, C.D.R., 1987. Proliferation of Pasteurella haemolytica in the calf respiratory tract after an abrupt change in climate Res. Vet. Sci., 42: 179.
- 50.- Kadel, W.L., Chengappa, M.M. y Herren, Ch.E., 1985. Field-trial evaluation of a Pasteurella vaccine in preconditioned and nonpreconditioned lightweight calves. J. Vet. Res., 46:1944.
- 51.- Kucera, C.J., Wong, J.C.S. y Feldner, T.J., 1983. Challenge exposure of cattle vaccinated with a chemically altered strain of Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res., 44:1848.
- 52.- Lea Master, B.R., Evermann, J.F., y Lehmkuhl, H.D., 1987. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootic of respiratory trac disease in recently weaned lambs. J.A.V.M.A., 190: 1545.
- 53.-Lehmkuhl, H.D., Contreras, J.A., Cutlip, R.C. y Brogden, K.A., 1989. Clinical and microbiologic findings in lambs inoculated with Pasteurella haemolytica after infection with ovine adenovirus type 6. Am. J. Vet. Res., 50:671.
- 54.- Lo, R.Y.C., Strathdee, C.A., y Shewen, P.E., 1987. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of Pasteurella haemolytica A1. Infect. Immunol., 55: 1987.
- 55.- López, A., Thomson, R.G. y Savan, M., 1976. The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with bovine parainfluenza 3 virus. Can. J. Comp. Med., 40: 385
- 56.- Lopez, A., Maxie, M.G., Savan, M., Ruhnke, H.L., Thomson, R.G., Barnum, D.A. y Geissinger, H.D., 1982. The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with Bovine Virus Diarrhea or Mycoplasma bovis. Can. J. Comp. Med., 46:302.
- 57.- Luna , L.G., 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd. Ed. Mac Graw-Hill Book Company. USA. 36.
- 58.- Maheswaran, S.K., Berggren, K.A., Simonson, R.R., Ward, G.E. y Muscoplat, C.C., 1980. Kinetics of interaction and fate of Pasteurella haemolytica in bovine alveolar macrophages. Infect. Immunol., 30:254.
- 59.- Markham, R.J.F. y Wilkie, B.N. 1980. Influence of bronchoalveolar washing supernatant and stimulated lymphocyte supernatants on uptake of Pasteurella haemolytica by cultured bovine alveolar macrophages. Am. J. Vet. Res., 41:443.
- 60.- Markham, R.J.F. y Wilkie, B.N., 1980. Interaction between Pasteurella haemolytica and bovine alveolar macrophages. Cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. Am. J. Vet. Res., 41: 18.

- 61.- Martin, S.W., Meek, A.H., Davis, D.G., Thomson, R.G., Johnson, J.A., Lopez, A., Stephe, L., Curtis, R.A. y Prescott, 1980. Factors associated with mortality in feedlot cattle. The Bruce county beef projet. Can. J. Comp. Med., 44: 1.
- 62.- Martínez, B.J., 1984. Eventos inflamatorios en el pulmón y su correlación con la remoción bacteriana en ratones inoculados con Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus. Tesis de maestría en Ciencias Veterinarias. Area Patología Animal. UNAM. México. 46.
- 63.- Martínez, A., Cuellar, O.J., Hernández, J., Pijoan, A.P. y Tórtora, P.J., 1988. Estudio sobre situaciones que determinan la mortalidad en corderos, en ranchos del Estado de México. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina. AMTEO. México. p.176.
- 64.- Mattson, D.E., 1973. Adenovirus infection in cattle. J. Am. Vet. Med. Ass., 163: 894.
- 65.- Mauderly, J.L., 1977. Bronchopulmonary lavage of small laboratory animals. Lab. Anim. Sci., 27: 255.
- 66.- Merchant, I.A. y Packer, A.A., 1975. Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Acribia, España p.348.
- 67.- Mishell, B.B. y Stanley, M.S., 1980. Selected methods in cellular immunology. 1st. ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA p. 219.
- 68.- Moore, R.N., Walker, R.D., Shaw, G.A., Hopkins, F.M. y Shull, E.P. 1985. Antileucotoxin antibody produced in the bovine lung after aerosol exposure to viable Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res., 46:1949.
- 69.- Moreno, C.B. 1990. Comunicación personal.
- 70.- Murguía O.L., 1988. Mortalidad en corderos de razas tropicales del nacimiento al destete. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina. México. p.173.
- 71.- Newman, R., Corstvet, R.E., Panciera, R.J., 1982. Distribution of Pasteurella haemolytica and Pasteurella multocida in the bovine lung following vaccination and challenge exposure as an indicator of lung resistance. Am. J. Vet. Res., 43:417.
- 72.- Nugent, K.M. y Pesanti, E.L., 1982. Staphylococcal clearance and pulmonary macrophage function during influenza infection. Infect. Immun., 38:1256.
- 73.- Ojeda, F.C. 1990. Comunicación personal.
- 74.- Panciera, R.J., Corstvet, R.E., Confer, A.W. y Gresham, C.N., 1984. Bovine Pneumonic pasteurellosis: Effect of vaccination with live Pasteurella species. Am. J. Vet. Res., 45: 2538.

- 75.- Pass, D.A. y Thomson, R.G., 1971. Wide distribution of Pasteurella haemolytica type 1 over the nasal mucosa of cattle. Can. J. Comp. Med., 35: 181.
- 76.- Pedroso, M., Fuentes, E.D., Fuentes, O., Muñoz, M.C. y Abeledo, M.A., 1988. Vacuna contra Pasteurella multocida Tipo A para terneros: Evaluación de tres vías de administración local. Rev. Salud. Anim., 10:93.
- 77.- Prince, D.V., 1985. Serotypes of Pasteurella haemolytica from the respiratory tract of sheep in New Zeland. N. Z. Vet. J., 33: 76.
- 78.- Pulido, F.M., 1991. Efecto potencial de diferentes adyuvantes en la respuesta inmune inducida por la administración de leucotoxina de Pasteurella haemolytica A-1 en conejos. Tesis de licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México. 1
- 79.- Purdy, C.W., Livingston, C.W., Frank, G.H., 1986. A live Pasteurella haemolytica vaccine efficacy trial. J. Am. Vet. Med. Assoc., 188: 589.
- 80.-Purdy, Ch.W., Straus, D.C., Livingston, Ch.W. y Foster, G.S., 1990. Immune response to pulmonary injection of Pasteurella haemolytica-impregnated agar beads followed by transthoracic challenge exposure in goats. Am. J. Vet. Res., 51:1629.
- 81.- Rimsay, R.L., Coyle-Dennis, J.E., Lauerman, L.H., et.al. 1981. Purification and biological characterization of endotoxin fractions from Pasteurella haemolytica. Am.J. Vet. Res., 42:2134.
- 82.- Rodríguez, L., López, M.A., Merino, M.M., Martínez, B.J. y Mondragón, I., 1987. Comparación entre deposición y remoción pulmonar o traqueal en ratones inoculados con Pasteurella haemolytica o Staphylococcus aureus. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México. p.6.
- 83.- Shewen, P.E., y Wilkie, B.N., 1982. Cytotoxin of Pasteurella haemolytica acting on bovine leukocytes. Infect. Immun., 35: 91.
- 84.- Shewen, P.E. y Wilkie, B.N., 1983. Pasteurella haemolytica cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by typespecific rabbit antisera. Am. J. Vet. Res., 44: 715.
- 85.- Shewen, P.E. y Wilkie, B.N., 1983. Pasteurella haemolytica cytotoxin neutralizing activity in sera from Ontario beef cattle. Can. J. Comp. Med., 47:497.
- 86.- Shewen, P.E., y Wilkie, B.N., 1985. Evidence for the Pasteurella haemolytica cytotoxin as a product of growing bacteria. Am. J. Vet. Res., 46: 1212.

- 87.- Shewen, P.E. y Wilkie, B.N., 1988. Vaccination of calves with leucotoxic culture supernatant from Pasteurella haemolytica. Can. J. Vet. Res., 52:30.
- 88.- Slocombe, R. F., Derksen, F. J., Robinson, N. E., Trapp, A., Gupta, A. y Newman, J. P., 1984. Interactions of cold stress and Pasteurella haemolytica in the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis in calves: Method of induction and hematologic and pathologic changes. Am. J. Vet. Res., 45:1757.
- 89.- Squire, P.G., Smiley, D.W., y Croskell, R.B., 1984. Identification and extraction of Pasteurella haemolytica membrane proteins. Infect. Immun., 45:667.
- 90.- Sutherland, A.D., Gray, E. y Wells, P.W., 1983. Cytotoxic effect of Pasteurella haemolytica on ovine bronchoalveolar macrophages in vitro. Vet. Microbiol., 8: 3.
- 91.- Sutherland, A.D. y Donachie, W., 1986. Cytotoxic effect of serotypes of Pasteurella haemolytica on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet. Microbiol., 11: 331.
- 92.- Sutherland, A.D., y Redmond, J., 1986. Cytotoxin from ovine strain of Pasteurella haemolytica: Characterization studies and partial purification. Vet. Microbiol., 11:336
- 93.- Trigo, T.J.F., 1984. Diagnóstico, patogénesis y control de las neumonías en ovinos (línea de investigación) . Memoria de la Reunion de Investigación Pecuaria en México, 1984. México, D.F.
- 94.-Trigo, F.J., Brezze, R.G., Liggit, H.D., Evermann, J.F. y Trigo, E., 1984. Interaction of bovine respiratory syncytial virus and Pasteurella haemolytica in the ovine lung. Am. J. Vet. Res., 45:1671.
- 95.- Trigo, T.F., 1987. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. En: Ciencia Veterinaria 4:1
- 96.- Velázquez, O.V., Navarrete, A.P. y Vera, C.H.E., 1987. Frecuencia de aislamiento de Pasteurella haemolytica y sensibilidad in vitro en cepas obtenidas de corderos de 0 - 90 días de edad en el valle de Toluca. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina. México. p.180.
- 97.-Walker, R.D., Corsvet, R.E., Lessley, B.A. y Panciera, R.J., 1980. Study of bovine pulmonary response to Pasteurella haemolytica: Specificity of immunoglobulins isolated from the bovine lung. Am. J. Vet. Res., 41:1015.
- 98.- Walker, R.D., Shultz, T.W., Hopkins, F.M. y Bryant, M.J., 1984. Growth phase-dependent phagocytosis of Pasteurella haemolytica by bovine pulmonary macrophages. Am. J. Vet. Res., 45: 1230.

99.- Wilkie, B.N. y Markham, R.J.F., 1979. Sequential titration of bovine lung and serum antibodies after parenteral or pulmonary inoculation with Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res., 40:1690.

100.- Wilkie, B.N., Markham, R.J.F. y 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.

101.- Wilkie, B.N., 1982. Respiratory tract immune response to microbial pathogens. J. Am. Vet. Med. Assoc., 181:1074.

102.- Williams, W., 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2:5.

103.- Yates, W.D.G., 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can. J. Comp. Med., 46:225.