

268
Reg.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**UTILIZACION DE RAYOS X E INFRARROJOS PARA
LA
CARACTERIZACION PARCIAL DE LA CASPSULA DE
Pasteurella multocida SEROTIPO D**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :
DELIA XOCHIL VEGA MANRIQUEZ**

ASESORES:

MVZ., MSc. José Angel Gutiérrez Pabello

MVZ., M en C. Enrique Salas Tellez

QFB., M en C. Enrique Angeles Anguiano



MEXICO, D.F. 1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**UTILIZACIÓN DE RAYOS X E INFRARROJOS PARA LA
CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA CÁPSULA DE
Pasteurella multocida SEROTIPO D**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por:
DELIA XOCHIL VEGA MANRIQUEZ

Asesores: MVZ., MSc. José Angel Gutiérrez Pabello
MVZ., M en C. Enrique Salas Tellez
QFB., M en C. Enrique Angeles Annguiano

MÉXICO, D.F.

1995

DEDICATORIA

A Dios:

En la quieta tarde de la eternidad,
mientras eras vida y fuego en expansión,
yo vivía en tu mente,
me acariciabas como un sueño de oro
y mi nombre lo llevabas escrito
en la palma de tu mano derecha.

Yo no lo merecía

pero Tú ya me amabas sin un por qué,
me amabas como se ama a un hijo único.

Y. Larrañaga.

A mi Madre Guadalupe Manriquez B.:

Por haber contribuido en el milagro de la concepción
y formar la persona que soy.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Departamento de Microbiología e Inmunología

A mis asesores: Por su paciencia, apoyo y haber contribuido en mi formación profesional.

Al Q.F.B. Italo Menconi: Por el interés al enseñarme el método de precipitación.

Al I.Q. Marco Antonio Leyba: Por el tiempo dedicado al trabajar los difractogramas de rayos x

A la Q. Rocío Patiño Maya: por haber realizado la espectroscopia de infrarrojo.

CONTENIDO

	<u>pagina</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	24
LITERATURA CITADA	25
APÉNDICE	31

RESUMEN

Vega Manriquez Delia Xochil. Utilización de rayos x e infrarrojos para la caracterización parcial de la cápsula de *Pasteurella multocida* serotipo D. Bajo la dirección de MVZ. J. Angel Gutiérrez Pabello, MVZ. Enrique Salas Tellez y QFB Enrique Angeles Angiano.

El presente trabajo va encaminado a utilizar rayos X e infrarrojos como métodos auxiliares para la identificación parcial del material capsular de *Pasteurella multocida* serotipo D, para lo cual se trabajaron 4 cepas de *Pasteurella multocida* serotipo D y 2 cepas del serotipo A las cuales fueron utilizadas como referencia, puesto que de ella se conoce su componente capsular que es ácido hialurónico. Todas las cepas se decapsularon resuspendiéndolas en NaCl 0.15 M 24 horas a 56 C en baño maria, posteriormente se centrifugó la biomasa a 14,000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante se dializó y el polisacárido se precipitó con una mezcla de etanol purificado y destilado y acetato de etilo a una concentración de 39:1. Al polisacárido se le realizaron estudios con rayos X por el método de los polvos y rayos infrarrojos, obteniéndose los siguientes resultados: Los rayos infrarrojos nos muestran la presencia de grupos funcionales OH y C-H, así como vibración de estiramiento y vibración de deformación en los dos serotipos capsulares. Un hallazgo interesante fue en la cepa 58 (serotipo A) donde la banda 1128 del grupo hidroxilo difiere con la banda 1116 del mismo grupo funcional de la cepa NL42D (serotipo D), lo cual nos proporciona un punto de comparación entre los dos grupos, que pudiera servir para diferenciar de manera parcial los polisacáridos capsulares de diferentes serotipos y diferentes bacterias. En los rayos X los resultados obtenidos en el ángulo $2\theta = 56$ presente en los dos grupos químicos fueron semejantes para los dos serotipos estudiados. La diferencia que se encontró fue que el serotipo A muestra un pico en el ángulo $2\theta = 56$ presente en los dos serotipos, pero con mayor intensidad que en el serotipo D, lo cual puede servir como una diferencia para identificar el material capsular de *Pasteurella multocida* serotipo D por este método.

INTRODUCCIÓN.

GENERALIDADES

Pasterelosis se le denomina a una serie de enfermedades producidas por microorganismos del género *Pasteurella* y sus diferentes especies, cuya distribución es mundial y afecta a varias especies animales incluyendo al hombre.

Las bacterias del género *Pasteurella* normalmente son comensales del aparato respiratorio superior y digestivo de mamíferos y aves, provocando enfermedad sólo cuando ciertos factores predisponentes permiten que se multipliquen sin control y venzan las defensas físicas e inmunológicas de las vías respiratorias. Muchas de estas infecciones resultan de la invasión de los microorganismos durante un periodo de estrés, pero la transmisión exógena ocurre por contacto con aerosoles, lo que se incrementa por vectores naturales, siendo importante las infecciones primarias causadas por virus y micoplasmas, las que predisponen las invasiones secundarias por *Pasteurella*, al deteriorar la función de los macrófagos alveolares y dañar el mecanismo mucociliar de la tráquea y los bronquios, por lo que son considerados patógenos secundarios (3,40).

Los factores predisponentes para que se manifiesten las diferentes pasterelosis de los animales domésticos pueden ser: a) para el cólera aviar: el saneamiento inadecuado, la ventilación deficiente y la mala higiene; b) para la neumonía y la fiebre de embarque de los bovinos y ovejas: exposición al frío, el clima lluvioso, la transportación por distancias largas, el hacinamiento, la fatiga e las infecciones recurrentes con el virus parainfluenza III, c) Para el complejo neumónico: la desnutrición, las condiciones deficientes de encierro y Pijoan menciona que es posible que algunas cepas poco patógenas del virus de la fiebre porcina clásica podrían actuar como desencadenantes del proceso neumónico (14, 29).

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Pasteurella multocida*

Son cocabacilos Gram negativos, miden cerca de 0.3 micras de ancho por 0.4 a 0.5 de largo, inmóviles, fermentativos, anaerobio facultativos, presentan tinción bipolar observándose los extremos con mayor intensidad que la parte central en los frotis de aislamientos frescos teñidos con Romanovsky, Wright o Giemsa (Kilian y Frederiksen 1981); poseen cápsula y no forman esporas. Esta bacteria utiliza algunos carbohidratos como son la glucosa, el manitol y la sacarosa con producción de ácido pero no de gas. La lactosa, la maltosa y la salicina no son aprovechados por la mayoría de las cepas. La mayor parte de las cepas son insolubles en bilis de bovino, unas cuantas son disueltas rápidamente. Son capaces de reducir los nitratos a nitritos y de producir indol, ácido sulfhídrico, catalasa, oxidasa y ornitín descarboxilasa (3,4,14,40).

En agar sangre *Pasteurella* se desarrolla produciendo colonias que para efectos prácticos se clasifican de la siguiente forma : a) colonias mucoides que son grandes, de moderada virulencia para el ratón; b) colonias lisas o fluorescentes de tamaño medio y discretas, sumamente virulentas para el ratón y c) colonias rugosas o azules de dimensiones pequeñas y discretas, que son de escasa virulencia para el ratón y autoaglutinables (14).

El crecimiento del microorganismo se facilita al utilizar medios como caldo infusión cerebro corazón, en donde el desarrollo se manifiesta un por ligero enturbiamiento y el depósito de un sedimento viscoso, siendo la temperatura óptima para el cultivo de 37 C. En agar sangre los cultivos mueren rápidamente y las resiembras deben hacerse por lo menos dos veces al mes (14).

Carter, en 1955, propuso un esquema de clasificación para agrupar a *Pasteurella multocida*, basándose en pruebas como la decapsulación por la hialuronidasa, la floculación en acriflavina, la iridiscencia colonial, la fermentación de carbohidratos, la patogenicidad para el ratón y la protección por suero (14, 32).

Pasteurella multocida tiene antígenos somáticos O, para los cuales se utilizan números arábigos para diferenciarlos; los antígenos capsulares se describen con letras por lo que una misma cepa puede tener un serotipo capsular y varios somáticos. Actualmente se conocen cinco grupos (A,B,D,E y F) clasificados con base en sus antígenos capsulares, y 16 serotipos somáticos que se clasifican del 1 al 16, encontrando en estos grupos diferencias de hospedador, virulencia y patogenicidad (4,14,20,22,33,40).

EPIZOOTIOLOGÍA:

Los microorganismos del serotipo A forman parte de la flora normal de tracto respiratorio de muchos animales domésticos, en México es el de mayor frecuencia e importancia en problemas respiratorios del ganado de carne. En perros, gatos y humanos está implicada en infecciones de heridas. Los serotipos B y E se asocian a la septicemia hemorrágica de los rumiantes en Asia y África respectivamente. El serotipo D se describe como agente causal del cólera aviar provocando aerosaculitis, neumonía y septicemia que son hallazgos comunes a la necropsia, causa una alta mortalidad y en el cerdo se considera comensal de aparato respiratorio alto comportándose como patógeno oportunista en casos de estrés manifestándose en rinitis atrófica y neumonía enzoótica en cerdos y ovinos. En ovejas y vacas causa una forma grave de mastitis que puede ocurrir en forma esporádica o enzoótica. En lechones y conejos provoca rinitis teniendo en estos últimos una presentación sobreaguda. Mientras que el serotipo F se ha descrito poco y se presenta en enfermedades de guajolotes siendo también susceptibles a la pastereiosis los caballos, las zarigüeyas, los roedores, los reptiles y las aves silvestres como patos, gansos, cisnes y pavos (11,14,20,24,30,32,35,40)

La rinitis atrófica es una enfermedad altamente contagiosa de los cerdos y se caracteriza por atrofia de los cornetes, distorsión de la nariz, hemorragia nasal que es causada por la asociación de *Bordetella bronchiseptica* y *P. multocida* serotipo D. Dichos microorganismos pueden ser aislados de cerdos con y sin signos clínicos. En EUA y Japón,

B. bronchiseptica es la causa principal de la rinitis. En Alemania y Holanda, *P. multocida* es considerada el patógeno primario. En los últimos años se ha creado una controversia respecto a quien causa la enfermedad (23,26,37,38)

PATOGENICIDAD:

La virulencia de *P. multocida* se asocia a la endotoxina y a la presencia de pili y cápsula así como a la producción de exotoxina. El serotipo D en particular, produce una exotoxina dermonecrótica, la cual es un metabolito excretado por la bacteria, su toxicidad desaparece a temperaturas superiores a 60 C y provoca atrofia nasal en los cornetes de los cerdos. Las lesiones que causa son irreversibles, no regenerativas en el hueso, estimulan la replicación celular y se ha demostrado que tienen un poder activador de fibroblastos *in vitro*, inducen la replicación de osteoclastos modificando su localización, incrementando el número a lo largo de los cornetes. Bustos, en 1994 mencionó que el efecto importante de la toxina dermonecrótica no es la trompa chueca o acortada, sino la necrosis de hepatocitos y parece que es, además inmunosupresora. (2,3,14,17,32)

En estudios realizados mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se encontraron diferentes secuencias en las regiones del gen de la toxina entre los serotipos capsulares A y D. Se llegó a la conclusión de que las regiones amplificadas por PCR son muy similares entre los dos serotipos capsulares. Por medio de esta técnica en un futuro se podría identificar cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida* tanto serotipo capsular A como D. (26)

La endotoxina se encuentra en la superficie de la bacteria por lo que se considera que una membrana externa rica en endotoxina es un rasgo característico de la bacteria gram negativa. Tiene efectos dañinos en el animal afectado como fiebre alta, hipotensión, coagulación intravascular y choque letal(33).

El pili es una estructura bacteriana corta y delgada que se compone de subunidades de proteína. Existen dos clases de pili: sexual y adherente, este último se reconoce como antígeno de colonización. Trigo y Pijoan en 1988, mencionan la existencia de pili en algunas cepas toxigénicas causantes de problemas de rinitis atrófica, lo cual favorece la adhesión, siempre y cuando existan las condiciones predisponentes para colonizar la mucosa (17,29,42).

Algunos factores como el aire frío que entra a la cavidad nasal provoca la ciliostasis del epitelio traqueal y el acúmulo constante de moco, facilitan la colonización del tracto respiratorio alto.(8)

La cápsula es la estructura más externa de la superficie de la bacteria y no es necesaria para su sobrevivencia, en cultivos de laboratorio requiere de una alta cantidad de energía en forma de ATP para ser sintetizada. Las bacterias que por mutación han perdido la cápsula, generalmente son avirulentas, por lo que las defensas del hospedador son más rápidas para actuar contra la bacteria. En el caso de bacterias que sí poseen dicha estructura, ésta les confiere resistencia en contra de bacteriófagos puesto que oculta los receptores específicos para estos virus, pero sobre todo juega un papel muy importante en contra de las defensas del huésped puesto que inhibe la actividad bactericida del suero, mediante una deficiencia en la activación de la cascada del complemento al interferir en la deposición del C3 en la superficie de la bacteria y formar un complejo H-C3b, el cual le confiere resistencia a la bacteria contra la opsonización, puesto que los anticuerpos no se pueden adherir porque la cápsula bloquea físicamente los antígenos de superficie presente en la pared bacteriana, aunque los anticuerpos pueden tomar la vía clásica del complemento y bloquear este mecanismo. De igual manera inhibe la adhesión de los neutrófilos en la membrana, lo cual se ha comprobado en *Pasteurella multocida* serotipo D al resistir a la fagocitosis y a la destrucción por parte de los neutrófilos polimorfonucleares de conejo y a la actividad bactericida intracelular (7,15,16,19,36,43).

El principal componente de la cápsula son los polisacáridos, los cuales son polímeros lineales con estructura repetida, y la antigenicidad es determinada por la estructura primaria compuesta por monosacáridos individuales, esto se ha comprobado al demostrar que los polisacáridos capsulares como el ácido siálico inactivan las proteínas de la vía alterna del complemento, en particular el factor H. En 1966, Prince y Smith, identificaron tres principales componentes asociados con la cápsula de *P. multocida*: a) Antígeno Beta: Tipo, específico de polisacáridos absorbido por las células rojas en la hemoaglutinación indirecta. b) Complejo alfa: Probablemente un complejo polisacárido-proteína, que se adhiere a la pared celular. c) Antígeno Gamma: lipopolisacáridos que componen la pared celular y que son responsables de las variantes serológicas (19,28,30,31)

En algunos estudios realizados se ha comprobado que el componente principal de la cápsula en *P. multocida* biotipo A es el ácido hialurónico, aunque también se ha descrito el [1-4-B]-D-xylan. En estudios realizados por Gutiérrez en 1992, se utilizó la prueba de hemoaglutinación indirecta para la serotipificación de *Pasteurella multocida*, posteriormente por medio de cromatografía en papel con un gradiente salino para la detección de ác. hialurónico, comparó el ácido hialurónico purificado con extracto salino de cepas de *Pasteurella multocida* serotipos A y D y encontró que los dos serotipos mostraban una migración al mismo nivel que el ácido hialurónico, siendo la del serotipo A una mancha más clara y más grande que la del serotipo D, lo que sugiere que el serotipo D puede contener en su cápsula una cantidad más pequeña de ác. hialurónico en comparación a la del serotipo A, o bien puede contener un material capsular que migre al mismo nivel del ác. hialurónico. A la fecha no se han realizado estudios para conocer la naturaleza química de la cápsula del serotipo D. (5,13,35)

RAYOS X E INFRARROJOS

El uso de métodos analíticos es una práctica rutinaria en la determinación de la estructura de los compuestos orgánicos. Estos métodos analíticos incluyen: espectroscopia, resonancia magnética nuclear, rayos infrarrojos, y difracción de rayos X; estas dos últimas técnicas fueron utilizadas en la presente investigación.

Método de Rayos infrarrojos

El principio de este método es que una molécula vibra constantemente por debajo de la fuerza de atracción sus enlaces se alargan y se contraen combinarse recíprocamente. La absorción de la luz infrarroja no produce cambios irreversibles en la molécula, porque la energía aplicada a la molécula es baja y ésta se pierde después en forma de calor. El diagrama del porcentaje de transmitancia se define como el radio de intensidad de la luz que pasa a través de la muestra (I) a la intensidad de la luz golpeando la muestra multiplicado por 100 contra la frecuencia de la radiación obteniéndose de esta manera el espectro de rayos infrarrojos (34).

La técnica de rayos infrarrojos utiliza fundamentos mecánicos cuánticos de energía vibracional interatómica. La variación de distancia (vibración de estiramiento o stretching ν) y de ángulo (vibración de deformación o bending δ) en los diferentes tipos de enlaces en las moléculas al ser expuestas a rayos infrarrojos, producen bandas que representan los grupos funcionales en la molécula. Cuando dos moléculas presentan grupos funcionales semejantes, entre 4000 y 1400 cm^{-1} las bandas son prácticamente idénticas; sin embargo, en nuestra gráfica de infrarrojo existe una zona de alta resolución, conocida como zona de huellas digitales que va de 1400 a 400 cm^{-1} . Esta zona se caracteriza en que cada compuesto químico presenta diferencias en la intensidad y la proporción de las bandas que aparecen en la región (34).

Método de Rayos X

El principio los rayos X es que pueden variar en reflexión, refracción y difracción, lo que demuestra su naturaleza de radiaciones electromagnéticas de corta longitud de onda. La trayectoria es rectilínea, sin desviarse por la acción de un campo eléctrico magnético, de lo que se deduce que no están formados por partículas cargadas. Los rayos X son resultado del choque de electrones acelerados con un cuerpo sólido. La longitud de onda es inversamente proporcional a la tensión aplicada para acelerar los electrones. El poder de la penetración se define como la capacidad que tiene el rayo de atravesar un cuerpo sin ser absorbido. Los

rayos X dependen de la longitud de onda; cuando es corta, los rayos son duros, de gran poder de penetración y en caso contrario son blandos (6).

Técnica de Difracción de rayos X por el método de los polvos: Los rayos X permiten estudiar estructuras sólidas para determinar el grado de cristalinidad, el estado de agregación y el tamaño de las partículas metálicas. Los electrones de los átomos ordenados en los cristales desvían los rayos X originando patrones de difracción a partir de los cuales se calculan los parámetros deseados. De esta manera la información proviene de la masa en su conjunto y las determinaciones correspondientes son por lo tanto, valores promediados dentro de esta masa que constituye el sólido. Por medio de esta técnica se pueden identificar los compuestos químicos que constituyen la muestra y evaluar la porción relativa de dichos compuestos y estimar el tamaño de sus cristales.(1)

HIPÓTESIS:

Los rayos **X** e infrarrojos pueden servir como métodos auxiliares para la caracterización parcial del material capsular de *Pasteurella multocida* serotipo **D**.

OBJETIVO

Caracterización parcial de los polisacáridos del material capsular de *Pasteurella multocida* serotipo **D**, utilizando difracción de rayos **X** y espectroscopia de infrarrojo.

MATERIAL Y MÉTODOS.

CEPAS. Se utilizaron cinco cepas de *Pasteurella multocida* serotipo D (NL46D, NL42D, Pm, 3/32) y dos serotipo A¹ (18MSB, 58), las cuales se obtuvieron del cepario del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

CRECIMIENTO DE LA BACTERIA

Para poder obtener una mayor biomasa y por lo tanto una mayor cantidad de cápsula se determinó la cinética de crecimiento de *Pasteurella multocida* serotipo D cepa NL65D, para lo cual se cultivó un preinóculo en Caldo Infusión Cerebro Corazón (CICC) de 300 ml durante 6 horas (hs) a 37 C en un biofermentador con aeración constante, con aire filtrado, y posteriormente se agregó a un matraz que contenía 3 litros (l) de CICC bajo las mismas condiciones y se procedió a medir la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nanómetros (nm). Se realizó la lectura cada media hora y con base en los resultados obtenidos se decidió utilizar la siguiente metodología descrita por Menconi et al., con modificaciones (25): De cada una de las cepas serotipo D (NL46D, NL42D, Pm, 3/32) y serotipo A de referencia (18MSB, 58) se preparó un preinóculo en un matraz fermentador de un litro que contenía 500 ml de CICC, en donde se sembraron 5 colonias de *Pasteurella multocida* crecidas en agar sangre. Después de un cultivo de 10 hs a 37 C con agitación y oxigenación continua, mediante el uso de una bomba, el preinóculo se pasó a un matraz fermentador de 4 l que contenía 3 l de CICC con las mismas condiciones de agitación y oxigenación que el preinóculo. Después de 10 hs de crecimiento se cosechó la biomasa por medio de un ciclo de centrifugación a 6,000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos (min).

¹ COMENTARIO. Se utilizaron cepas de *Pasteurella multocida* serotipo A como referencia porque se conoce su componente capsular que es el ácido hialurónico (5).

DECAPSULACIÓN:

El método de descapsulación que se utilizó es el descrito por Cifonelli y col. para *Pasteurella multocida* biotipo A (5), con modificaciones propias y adaptadas para *Pasteurella multocida* serotipo D.

El caldo con crecimiento bacteriano se centrifugó a 6,000 rpm por 15 min. a la pastilla obtenida que contenía las bacterias se le adicionaron 20 ml de NaCl 0.15M y se calentó en baño maría a 56 C, con agitación. El desprendimiento capsular se observó mediante frotis teñidos con Maneval. La lectura se hizo cada hora hasta completar 6 hs; después cada 2 hs hasta llegar a 12 hs y por último a las 24 y 48 hs. Posteriormente la solución se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min, se desechó el sobrenadante y se realizó un frotis del sedimento que contenía a las bacterias para observar la disminución de la cápsula.

La pastilla se resuspendió en solución salina fisiológica 0.15 M y se inactivó a 56 C en agitación por 24 hs; se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 30 min para obtener el sobrenadante que contenía la cápsula, se dializó en una membrana de celulosa (12,000 de corte), durante 4 hs con agua corriente y posteriormente durante 24 hs con agua destilada. El sobrenadante dializado contenía el polisacárido el cual se procedió a precipitar.

PRECIPITACIÓN DEL POLISACÁRIDO.

El polisacárido se precipitó con una mezcla de etanol purificado-destilado y acetato de etilo 39:1. Una vez precipitado, se dejó secar completamente a temperatura ambiente en una caja petri.(25)

TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DEL POLISACARIDO.

El polisacárido se dejó secar hasta que tuviera la menor cantidad de líquido, después se mezcló con bromuro de potasio, se comprimió la mezcla para formar una pastilla que se colocó en las celdas de cloruro de sodio del espectrofotómetro, donde se proyectaron los rayos infrarrojos y se obtuvo el espectro que se analizó por computadora. Los resultados se expresaron en cm^{-1} y se compararon con los intervalos de frecuencia preestablecidos para grupos funcionales ya publicados en diferentes catálogos (34).

Se pulverizó el polisacárido perfectamente en un mortero de ágata, se colocó la muestra en el portamuestras del goniómetro que es parte del difractómetro de rayos X, después se ajustó la fuente de poder a 30 kv 20 mA, se programó la computadora con los parámetros deseados que de intervalo angular, tamaño de paso de 0.02 grados y el tiempo de 0.4 segundos; después se procedió a medir el intervalo angular de 2 theta entre 5 a 80 grados obteniéndose posteriormente el difractograma de la muestra, del cual se tomaron los tres picos más altos para hacer la interpretación (6).

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJO CONTRA *Pasteurella multocida* SEROTIPO A Y D:

Se utilizaron 2 conejos hembras de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 2 Kg de peso para cada serotipo. Se les dieron 15 días de adaptación.

Las cepas NL65D perteneciente al serotipo D y la 58 que corresponde al serotipo A se sembraron en agar sangre, se incubaron a 37 C por 24 hs, se cosecharon en una solución amortiguadora de fosfatos (Phosphate Buffered Saline: PBS) con un pH de 7 con formol al 0.3 % se ajustó la concentración de la bacteria a una densidad 1 de Mc Farland. Se dejaron pasar 3 hs para inactivarla y posteriormente se inocularon los conejos por vía endovenosa.(10,27,39,41).

El calendario de inoculación se basó en lo reportado por Gutiérrez, y col y Johnston, y col con modificaciones (cuadro 1).

En la primera semana se inocularon 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund via subcutánea y 0.5 ml del inoculo via endovenosa. (12,18)

CUADRO No. 1: PROGRAMA DE INOCULACIÓN DE LOS SEROTIPOS

SEMANA	CANTIDAD EN ml SEROTIPO A	CANTIDAD EN ml SEROTIPO D
1	0.5	0.5
2	0.5	0.5
3	1	1
4	1	1
5	1.5	1.5
6	2	2
7	2	2
8	2.5	2.5
9	2.5	2.5
10	3	3
11	3	3
12	3	3
13		3
14		3.5
15		3.5
16		3.5
17		3.5
18		3.5
19		4
20		4

Al finalizar con el calendario de inoculación se sangraron por punción cardíaca, se separó el suero del paquete blanco que contiene a los leucocitos (9), el cual se colocó en baño María a 56 C por 1 h para inactivar el complemento (17) y se congeló a -70 C.

**TITULACIÓN DE LOS ANTISUERO Y POLISACÁRIDOS:
HEMOAGLUTINACIÓN DIRECTA.(37)**

ANTÍGENO: Cápsula de *Pasteurella multocida* serotipo A

Cápsula de *Pasteurella multocida* serotipo D

Polisacárido precipitado correspondiente a los serotipo A y D.

DESARROLLO

Preparación del polisacárido: En 10 ml de PBS se disolvió 1 mg de polisacárido, y a partir de este primer tubo se hicieron diluciones dobles seriadas, tomándose 3 ml de PBS más 3 ml de polisacárido (tubo 1); en el caso del serotipo A se hicieron hasta 4 diluciones y del serotipo D 3 diluciones, siendo en los dos casos diluciones dobles seriadas.

Obtención de la Cápsula: Se sembraron las cepas de *P. multocida* serotipo A y D en agar sangre se incubaron a 37 C por 24 hs. Se cosecharon las cepas por separado en 1 ml de PBS al 0.02 M con pH 7.2 con 200 unidades por mg de hialuronidasa para desprender la cápsula y se incubaron por 2 hs en baño María a 37 C. Posteriormente se calentaron en baño maria a 100 C por 1 h se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min y del sobrenadante que contenia la cápsula se tomaron 2 ml de cada cepa.

Se tomaron 2ml de las diferentes diluciones del polisacárido y 2 ml de las diluciones de la cápsula, se pusieron en contacto por separado los serotipos A y D con glóbulos rojos de ovino al 10%. Se incubaron 1 h a 37 C en baño maria con agitación para inducir la unión de los glóbulos rojos con el antígeno, después se centrifugaron los glóbulos rojos tres veces a 1500 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante para eliminar el antígeno no adherido. El sedimento se resuspendió en 20 ml de PBS con albúmina sérica bovina al 0.25 % para obtener una concentración de 1 % de glóbulos rojos sensibilizados.

En una microplaca con fondo en forma de U se colocaron 100 μ l de PBS en cada pozo. Al pozo de las primeras 4 hileras se le adicionaron 100 μ l del suero antiserotipo A y al primer pozo de las otras 4 hileras se le agregaron 100 μ l del suero antiserotipo D. En otra placa se colocaron 100 μ l de las diferentes diluciones del polisacárido a partir de ellos se realizaron diluciones dobles. Por último, se colocaron 100 μ l de glóbulos rojos de ovino sensibilizados con el antígeno en toda la placa, se dejó actuar a temperatura ambiente y se observó el resultado.

Las diluciones del Polisacárido se muestran en el cuadro 2.

CUADRO No. 2 DILUCIONES DEL POLISACÁRIDO

SEROTIPO A			
POZO	COLUMNA	DILUCIONES	CLAVE
1	1	1:10 000	A1
1	2	1:20 000	A2
1	3	1:40 000	A3
1	4	1:80 000	A4
SEROTIPO D			
1	1	1:10 000	D1
1	2	1:20 000	D2
1	3	1:40 000	D3

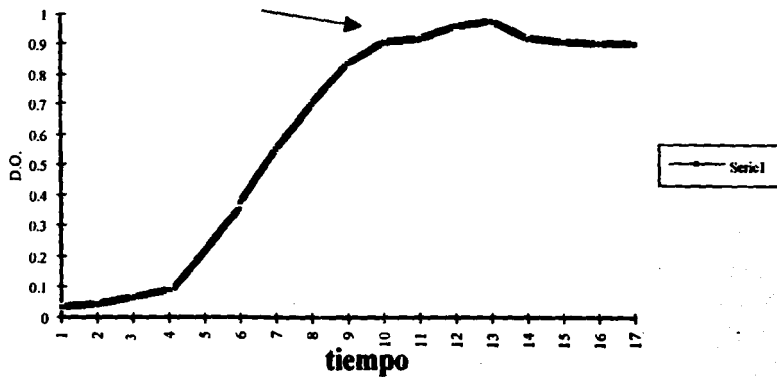
RESULTADOS.

En el cuadro No. 3 y en la gráfica No 1 se muestra la cinética de crecimiento de *Pasteurella multocida* serotipo D cepa NL45 D donde se aprecia una etapa de adaptación de 4 horas y un pico de crecimiento de 5:30 hs a partir de las 7:00 hs, además se observa que la absorbancia comienza a disminuir.

CUADRO No 3 CINETICA DE CRECIMIENTO

TUBO	HORA	ABSORBANCIA (580 nm)
1	30 min	0.033
2	1hr	0.041
3	1hr 30 min	0.064
4	2 hr	0.088
5	2hr 30 min	0.088
6	3 hr	0.375
7	3 hr 30 min	0.550
8	4 hr	0.697
9	4 hr 30 min	0.834
10	5 hr	0.903
11	5 hr 30 min	0.913
12	6 hr	0.954
13	6 hr 30 min	0.970
14	7 hr	0.917
15	7hr 30 min	0.905
16	8 hr	0.900
17	8 hr 30 min	0.900

Cinética de crecimiento de *Pasteurella multocida* serotipo D



Decapsulación de *Pasteurella multocida* serotipo D:

En los frotis se observó una disminución del material capsular de las bacterias, conforme transcurría el tiempo. A las 24 horas se había desprendido una gran parte de la cápsula, y a las 48 hs no se determinó una diferencia significativa, por lo que se eligió el tiempo de 24 hs como el necesario para que la biomasa estuviera en contacto con NaCl 0.15 M en el baño María a 56 C, en agitación constante y se liberara la cápsula (cuadro No 4).

CUADRO No 4 EVALUACIÓN DEL DESPRENDIMIENTO CAPSULAR

HORAS

1	Desprendimiento escaso
12	Desprendimiento moderado
24	Desprendimiento mayor
48	Desprendimiento ligeramente mayor

Titulación de los antisueros y del polisacárido por la técnica de hemoaglutinación :

En el cuadro No. 5 se observan los diferentes títulos alcanzados por los antisueros de *Pasteurella multocida*, siendo en el serotipo A de 1:256 a las 12 semanas de inoculación y en el serotipo D de 1:32 a las 20 semanas de inoculación. En los resultados de las diluciones de los polisacáridos, tanto de las cepas biotipo A como las del serotipo D, se observó una aglutinación a partir del pozo 2 hasta el pozo 5 en todas las diluciones que menciona el cuadro No 2, lo que indicó la unión del suero antiserotipo A y D respectivamente con los glóbulos rojos sensibilizados con el polisacárido capsular. No existió autoaglutinación de los glóbulos rojos. (cuadro No. 5)

CUADRO No. 5 HEMOAGLUTINACIÓN INDIRECTA

TÍTULO	SEROTIPO A	SEROTIPO D
1:2	+	+
1:4	+	+
1:8	+	+
1:16	+	+
1:32	+	+
1:64	+	-
1:128	+	-
1:256	+	-
1:512	-	-

ESPECTROSCOPIA DE INFRAROJO. (Expresado en cm^{-1})

Los resultados obtenidos de los rayos infrarrojos mostraron en las diferentes cepas una banda estirada de 3448 cm^{-1} para el grupo hidroxilo, y bandas de tipo deformante que van de 1624 a 1662 cm^{-1} y de 1113 a 1128 cm^{-1} . En cuanto al grupo funcional C-H las bandas encontradas fueron estiradas con valores de 2094 a 2923 cm^{-1} . En el cuadro No. 6 y en los espectros de infrarrojo se muestra con más detalle las bandas de los diferentes grupos funcionales para cada una de las cepas trabajadas.

CUADRO No. 6 GRUPOS FUNCIONALES ENCONTRADOS EN *Pasteurella multocida*

CEPAS SEROTIPO D	GRUPOS HIDROXILO	GRUPO C-H
NL46D	3448, 1637, 1116	2095
NL42D	3448, 1662, 1116	2094
Pm	3448, 1654, 1113	2294, 2185, 2112
3/32	3448, 1624, 1124	2923, 2250, 2185, 2112
CEPAS SEROTIPO A		
18 MSB	3448, 1643, 1120	2920, 2852, 2206, 2109
58	3448, 1624, 1128	2111

Pasteurella multocida serotipos capsulares A y D mostraron picos similares en el ángulo de 2θ, los cuales se observan en el cuadro No 7. La diferente intensidad característica puede apreciarse en los difractogramas de las cepas trabajadas.

CUADRO No 7 RESULTADOS DE *Pasteurella multocida* A Y D EN EL ÁNGULO 2θ

CEPAS SEROTIPOS D	ÁNGULO 2 θ
Pm	29, 34, 49, 56, 71-72
3/32	29, 34, 49, 56, 71-72
NL42D	29, 34, 49, 56, 71-72,
CEPAS SEROTIPO A	
18 MSB	29, 34, 49, 56, 71-72
58	29, 34, 49, 56, 71-72

Los difractogramas de rayos X de las cepas trabajadas se numeraron de la manera siguiente:

Difractograma 1 cepa Pm, 2 cepa 3/32, 3 cepa NL42D, 4 cepa 18 MSB, 5 cepa 58

DISCUSION:

Los picos característicos, propios de cada polisacárido capsular bacteriano mostrados en los difractogramas de rayos X, revelaron tanto diferencias como semejanzas en los grupos químicos del material capsular, mismo que dependió del serotipo de *Pasteurella multocida* del que procedía, por ejemplo, en los difractogramas de las cepas serotipo A se encontró un pico en el ángulo $2\theta=56$ más intenso en comparación con el encontrado en el serotipo D. Es importante señalar que las estructuras difractográficas que se emplearon como parámetro diferencial entre las cepas mencionadas son de naturaleza desconocida, debido a que se carece de un patrón de referencia establecido. Así mismo se debe considerar la existencia de un patrón regular para el pico mencionado $2\theta=56$ para las cepas citadas y obtenidas bajo las mismas condiciones metodológicas. Este comportamiento sugiere un posible elemento de caracterización o identificación, no reportado hasta la fecha en la literatura disponible.

Los rayos infrarrojos mostraron diferencias correspondientes a la banda 1128 del serotipo A cepa 58, lo que sugiere que es una estructura distinta de la encontrada en la banda 1116 del serotipo D cepa NL-42D, y que se pueden aplicar como criterio diferencial entre los dos serotipos. Considerando que no existen antecedentes del empleo de esta técnica para identificar los grupos funcionales del material capsular de *Pasteurella multocida* serotipo D, los resultados se consideran favorables, puesto que se pueden complementar con los obtenidos de los difractogramas de rayos X, así como con los de resonancia magnética nuclear y carbono 12 en estado sólido y espectrometría de masas para conocer el compuesto químico de la cápsula de *Pasteurella multocida* serotipo D.

Los métodos descritos para decapsulación de bacterias resultaron poco eficaces, por lo que fue necesario modificar el tiempo de permanencia en el baño maría para favorecer la obtención del material capsular.

La técnica de Menconi, y col. permitió comprobar resultados favorables para la precipitación del polisacárido capsular de *Pasteurella multocida* serotipo D, al obtenerse 500 mg de

La técnica de Menconi, y col permitio comprobar resultados favorables para la precipitación del polisacárido capsular de *Pasteurella multocida* serotipo D, al obtenerse 500 mg de polisacárido capsular seco, mostrando una mayor eficacia en comparación con las técnicas propuestas por Yerewicz, y col. (44) y Lac, y col. (21)

Durante el estudio se implementó la titulación de suero mediante hemoaglutinación indirecta lo que permitió corroborar la presencia del polisacárido en el precipitado al observarse una aglutinación de los glóbulos rojos con el antígeno. Para la producción del antisuero se inocularon conejas hasta la obtención de los títulos adecuados de anticuerpos siendo 1:256 a las 12 semanas para el serotipo A y 1:32 a las 20 semanas para el serotipo D. Los bajos títulos de anticuerpos observados en las inoculaciones iniciales se pueden atribuir a diversos factores tanto del ambiente como propios del animal.

CONCLUSIONES.

Las técnicas de difracción de rayos X e infrarrojos no son susceptibles de ser consideradas como puntos de comparación con respecto a su eficacia para caracterizar polisacáridos capsulares de *Pasteurella multocida* serotipo D.

Los métodos de espectroscopia de infrarrojo y difracción de rayos X por el método de los polvos se pueden emplear de manera complementaria para caracterizar el material capsular de *Pasteurella multocida* serotipo D.

La caracterización del material capsular de *Pasteurella multocida* serotipo D se puede complementar con el análisis de espectrometría de masas de alta resolución (FAB Fast Atomic Bombardier) y resonancia magnética nuclear de hidrógeno y Carbono 13, para que con base en las características espectroscópicas y comparando tales resultados con los reportados en la literatura química sea posible establecer la estructura del (de los) polisacárido(s) presente(s).

LITERATURA CITADA

1. Bosch, G. P. y Domínguez, J. M.: **Técnicas experimentales en la caracterización de catalizadores**. 1 ed. Instituto Mexicano del Petróleo, México, D.F., 1986.
2. Bustos, S. J. R.: Rinirris atrófica II.- Control mediante vacunación y/o medicación e impacto económico. Primer ciclo Nacional Afecciones Respiratorias del cerdo. Yucatán México, 21-34 1994.
3. Carter, G. R. and Chengoppa, M. M.: **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4th ed. *Leas Febiger*, Philadelphia, 1991.
4. Carter G.R.: Genus I *Pasteurella*, **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Edited by: Krieg, N. R. and Holt, J. G. 555-556, Williams and Wilkins. United States of America, 1984.
5. Cifonelli, J. A., Rebers, P. A. and Heddleston, K. H.: The isolation and characterization of hyaluronic acid from *Pasteurella multocida*. **Carb. Res.**, 14: 272-276 (1970).
6. Cullty, B. D.: **Elements of x-ray diffraction**. *Addison-Wesley Publishing Company, Inc.*, United States of America, 1967.
7. Czuprynsky, Ch. J. and Sample, K. A.: Interactions of *Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella* Bacteria with Phagocytic Cell. **Can. J. Vet. Res.**, 54: 36-40 (1990).
8. Dugal, F. Belanger, M. and Jacques, M.: Enhanced adherence of *P. multocida* to porcine tracheal rings preinfected with *B. bronchiseptica*. **Can. J. Vet. Res.**, 56: 260-264 (1992).

9. Garvey, J. S., Cremer, N. E. and Sussdorf, D. H. *Methods in Immunology*. 3th ed. *W. A. Benjamin Inc.* Massachysetts U.S.A., 1977.
10. Glorioso, Jones, Rush, Pentler, Darif, Cowrd.: Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infection. *Infect. Immun.*, 35: (1982).
11. Gorafa, H. E. Trigo, T.F.J. Sánchez-Mejorada, P.H. and Aguilar, R. F.: Serotypes of *P. multocida* in beef cattle in Mexico. *Vet. Mex.*, 19: 199-204 (1988).
12. Gutiérrez, C.B., Argüello, J.L., Vázquez, J.A., Tascón, R.T. y Rodríguez, E.F.: Comparación de dos métodos de hiperinmunización de conejos frente a serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Med. Vet.*, 7: 43-49 (1990).
13. Gutiérrez P. J. and Smith J. E.: Determinación de la presencia de ácido hialurónico en el material capsular de cepas de *Pasteurella multocida* tipo A y D aisladas de pulmones de cerdo. *Vet. Mex.*, 24: 113-116 (1993).
14. Hagan y Bruner: *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos*. 4 ed *La Prensa Medica Mexicana S. A.*, Mexico, D. F., 1983.
15. Harmon, B. G. Glisson, J.R. Latimer, K. S. Steffens, W. L. Nunnally, J. C. Resistance of *Pasteurella multocida* A:3,4 to phagocytosis by turkey macrophages and heterophils. *Am. J. Vet. Res.*, 52: 1507-1511 (1991).
16. Inzana, T. J.: Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. *Can. J. Vet. Res.*, 54: 22-27 (1990).

17. Jawetz, H., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S. and Ornston, L. N.: *Micobiología Médica*. 13a ed. *El Manual Moderno*, Mex. D. F., 1990.
18. Johnston, B. A., Elisen, H. and Fry, D.: An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbit. *Lab. Anim. Sci.*, 41: 15-21 (1991)
19. Kasper, D. L.: Bacterial capsule- old dogmas and new tricks. *J. Inf. Dis.*, 153: 407-414 (1986)
20. Kodama, H., Matsumoto, M. and Snow, L.M.: Immunogenicity of capsular antigens of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 24: 1838-1841 (1981).
21. Lac, T. Y.; Gotschlich, E.C, Jonssen, E. K. and Wysocki, J. R.: Studies on the meningococcal polysaccharides. *J. of Biol. Chem.*, 248: 2519- 2858 (1971).
22. Lariviere, S., Leblanc, L., Mittal, K. R. and Martineau, G. P.: Characterization of *P. multocida* from nasal cavities of piglets from farms with or without atrophic rhinitis. *J. of Clin. Microbiol*, 30: 1398-1401 (1992).
23. Lariviere, S, Leblanc, L., Mittal, K. R. and Martineau, G. P.: Comparison of isolation methods for the recovery of *B. bronchiseptica* and *P. multocida* from the nasal cavities of piglets. *J. of Clin. Microbiol.*, 31: 364-367 (1993).
24. Magyar, T. and Rimler, R. B.: Capsule depolymerization to *Pasteurella multocida*. Proceedig of the international conference in Edinburgh : 31 july-4 august, 1994

25. Menconi, I., Nuñez, A., Garrido, R., Angeles, E., Salas, E. and Cervantes, R.: New method to obtain *C. neoformans* capsular polysaccharide. XII Congress of the International Society for Human Animal Mycology, Adelaide, March 1994 13-18.
26. Nagai, S., Someno, Yagihashi, T.: Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *P. multocida* by PCR. *J. Clin. Microb.*, 32: 1004-1010 (1994)
27. Nakai, Sawata, Tsuji, Samejima, Kume. Purification of dermonecrotic toxin from a sonic extrac of *Pasteurella multocida* SP-72 serotype D. *Infect. Immun.*, 46: (1984).
28. Suárez Guemes, F.: Mecanismo de patogenicidad bacteriana, *Bacteriología general principios químico biológicos*. editado por: *Fac. de Med. Vet. y Zoot. Unive. N. Aut de Mex.*, México, 366-368 D.F. 1990.
29. Pijoan, C.: Neumonía enzoótica, *Ciencia veterinaria*. Editado por *Moreno Ch. R.* 1:56-73 Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1987
30. Pijoan, C. and Trigo, F.: Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. *Can. J. Vet. Res.*, 54: 516-521 (1990).
31. Prince, G. H. and Smith, J. E.: Antigenic studies on *Pasteurella multocida* using immunodiffusion techniques I. Identification of soluble antigens of bovine Hemorrhagic septicemia strain. *J. Comp. Pathol.*, 76:303-314 (1966)
32. Rhoades K. R. and Rimler R. B.: Virulence and toxigenicity of capsular serogroup D *Pasteurella multocida* strains isolated from avian hosts. *Avian. Dis.*, 34: 384-388 (1990).

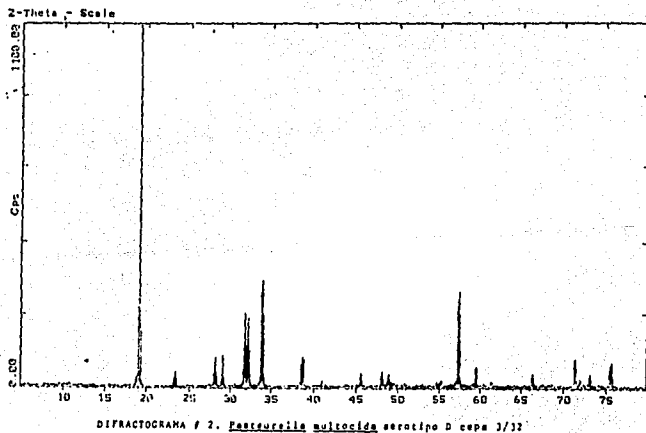
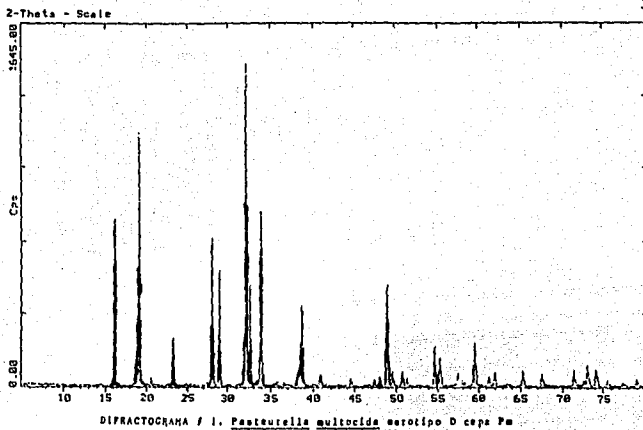
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

29

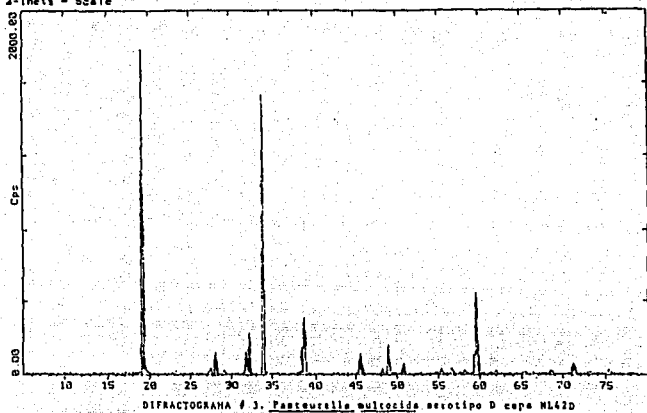
33. Rietschel, E. T. y Brade, H.: Endotoxinas bacterianas. *Investigación y ciencia*, 16-24 (1992)
34. Roberts, R. M. Gilbert, J. C. Rodewald, L. B. Wingrove, A. S.: **Modern experimental organic chemistry**. 3th ed. *Holt, Rinehart and Winston*, United States of America, 1979.
35. Rosner, H. Grimmecke, H.D. Knirel, Y. A. and Shashkov, A. S.: Hyaluronic acid and a (1-4)-B-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. *Carb. Res.*, 223: 329-333 (1992).
36. Rush, H. G.: Resistance of some capsular serotype D strains of *Pasteurella multocida* to rabbit polymorphonuclear neutrophil phagocytosis. *Vet. Microbiol.*, 20: 79-87 (1989).
37. Sakano, T., Okada, M., Taneda, A., Ono, M. and Sato, S.: Experimental atrophic rhinitis in 2 and 4 month old pigs infected sequentially with B. b> and toxigenic type D *P. multocida*. *Vet. Microbiol.*, 31:197-206 (1991).
38. Sakano, T., Okana, T., Okada, M., Taneda, A., Ono, M., Sato, S and Hayashi, Y.: Toxigenic type A *P. multocida* as a causative agent of nasal turbinate atrophy in swine. *J. Vet Med.*, 54: 403-407 (1992).
39. Sawada, Rimler, Rhoades. Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. *J. Clin. Microbiol.*, 15: 752-756 (1981).
40. Shewen, P. E.: *Pasteurella*, Pathogenesis of bacterial infections in animals. Edited by: Carlton L. Gyles and Charles O. Thoen, 216-220, *I S.P.A.* USA, 1993.

41. Syuto, Matsumoto. Purification of a protective antigen from a saline extract of *Pasteurella multocida*. **Infect. Immun.**, 37: 1218-1226 (1982).
42. Trigo, F., Pijoan, C.: Presence of pili in *Pasteurella multocida* strains associated with atrophic rhinitis. **Vet. Rec.**, 122: 1-19 (1988).
43. Troy, F.A.: The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. **Ann. Rev. Microbiol.**, 33: 519-560 (1979).
44. Yurewicz, E. C., Ghalambor, M. A and Heath, E. C.: The structure of *Aerobacter aerogenes* capsular polysaccharide. **J. Biol. Chem.**, 246: 5596-5606 (1971).

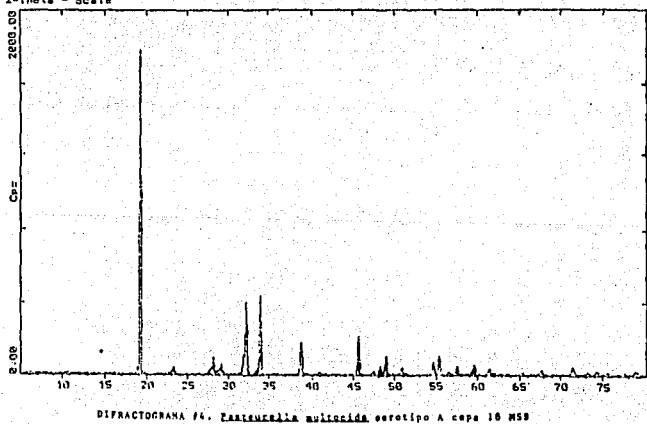
APÉNDICE



2-Theta - Scale

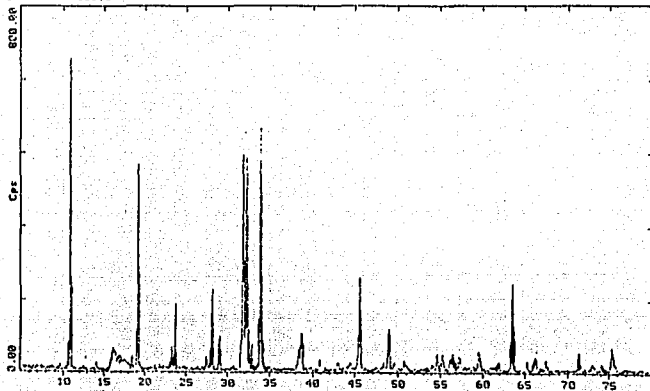


2-Theta - Scale

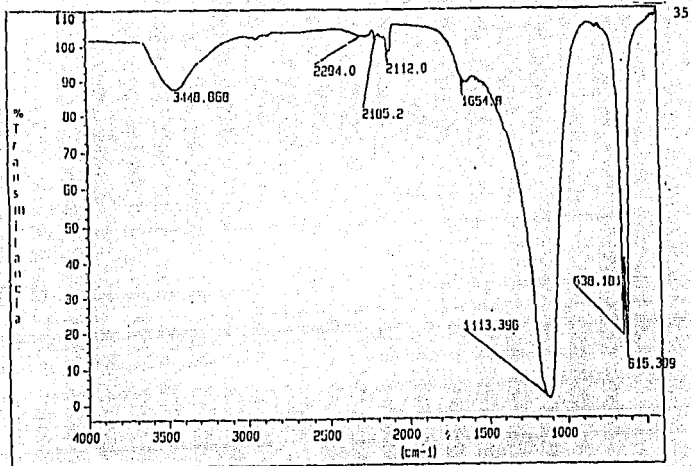


2-Theta - Scale

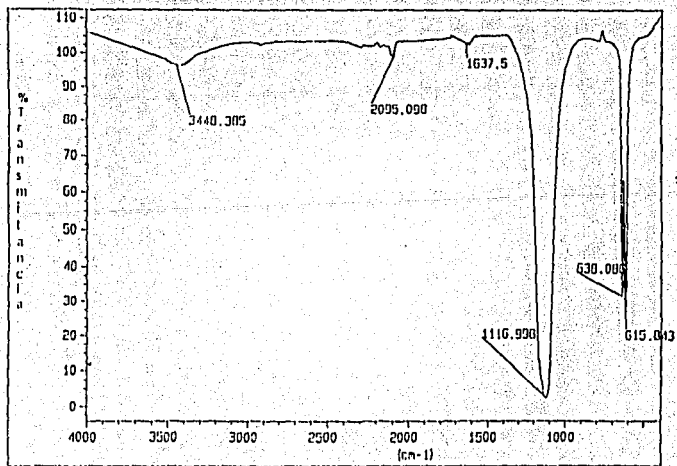
34



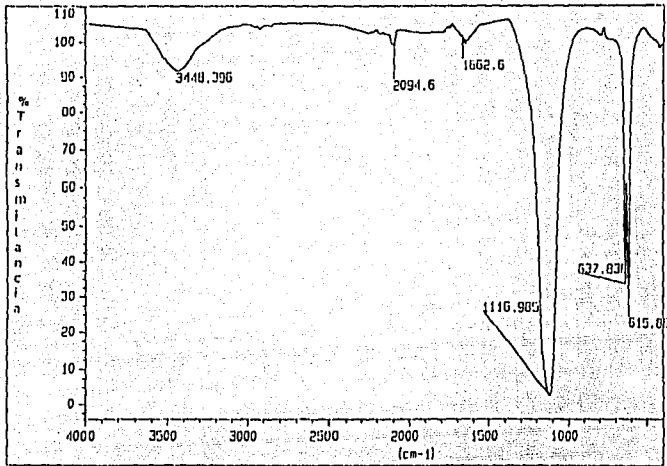
DIFFRACTOGRAM # 5 Pasteurella multocida serotipo A Cope 50



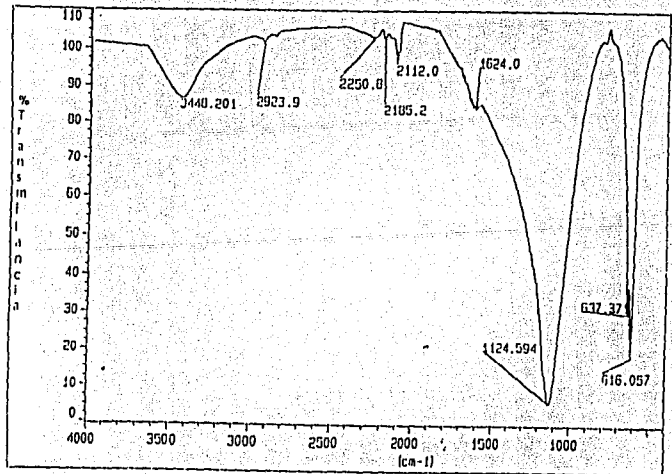
ESPECTRO DE INFRARROJO # 1. *Pasteurella multocida* serotipo D cepa Pa



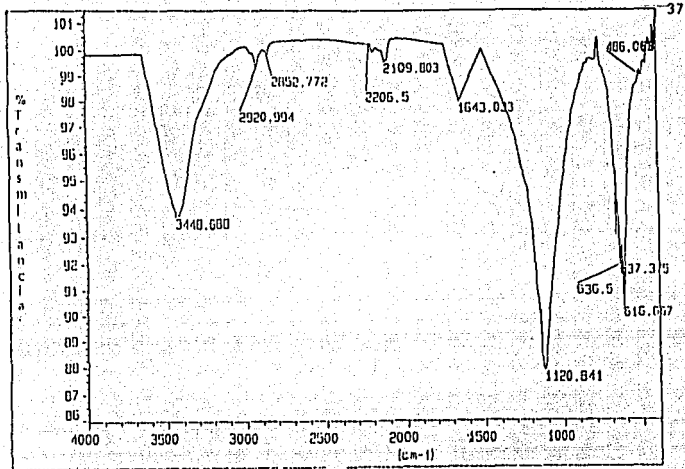
ESPECTRO DE INFRARROJO # 2. *Pasteurella multocida* serotipo D cepa ML46b



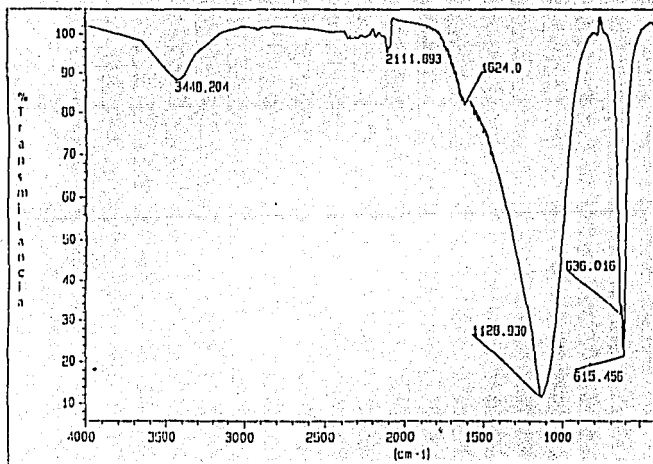
ESPECTRO DE INFRARROJO # 3. *Panicorella multisepta* var. cepa HL47D



ESPECTRO DE INFRARROJO # 4. *Panicorella multisepta* var. cepa 3732



ESPECTRO DE INFRARROJO # 5. Pasteurella multocida serotipo A cepa IA 15A



ESPECTRO DE INFRARROJO # 6. Pasteurella multocida serotipo A cepa 58