

58



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“EVALUACION DE DOS INMUNOGENOS
UTILIZADOS PARA PREVENIR LA PASTERELOSIS
NEUMONICA EN CORDEROS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N :

LETICIA SALAZAR RAMOS

ISIDRO TELLEZ LEON

ASESORES: M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
M. en C. JOSE FRANCISCO MORALES ALVAREZ

287177



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“EVALUACIÓN DE DOS INMUNÓGENOS UTILIZADOS PARA PREVENIR
LA PASTERELOSIS NEUMÓNICA EN CORDEROS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N :

LETICIA SALAZAR RAMOS

ISIDRO TÉLLEZ LEÓN

ASESORES:

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ

M. en C. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación de dos inmunógenos utilizados para prevenir la pasterelosis neumónica en corderos"

que presenta la pasante: Leticia Salazar Ramos
 con número de cuenta: 9460616-4 para obtener el título de
Médica Veterinaria Zootecnista

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de octubre de 2000

- PRESIDENTE M. en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz
- VOCAL M. en C. Alejandro Martínez Rodríguez
- SECRETARIO M.V.Z. Martha Elizabeth Pérez Arias
- PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Juan Sebastian Barrientos Padilla
- SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. María Consuelo Dueñas Sanson

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación de dos inmunógenos utilizados para prevenir la pasterecolosis neumónica en corderos"

que presenta el pasante: Isidro Téllez León
con número de cuenta: 9101218-2 para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de octubre de 2000

PRESIDENTE

M. en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz

VOCAL

M. en C. Alejandro Martínez Rodríguez

SECRETARIO

M.V.Z. Martha Elizabeth Pérez Arias

PRIMER SUPLENTE

M.V.Z. Juan Sebastian Barrientos Padilla

SEGUNDO SUPLENTE

M.V.Z. María Consuelo Dueñas Sanson

[Handwritten signatures and initials]

A mis padres:

Por el esfuerzo que realizaron para darme lo necesario y poder llegar a esta meta. Deseo expresarles que mis ideales, esfuerzos y logros también son suyos.

Con cariño, admiración y respeto.
Los quiero mucho

A mis hermanos Alejandro, Patricia y Bibiana;
así como a Norma y Carlos:

Por preguntones, ya que es una forma de expresar interés en mi persona y en mi carrera y saber que cuento con ustedes.

Espero que Paty y Bi logren sentir la satisfacción que da el llegar hasta la meta, cualquiera que esta sea.

A Isidro:

Gracias por tenerme paciencia durante todo el trabajo de la tesis, por estar conmigo y ser parte de este logro.

Además por compartir con gusto lo que tenemos.

Al M. en C. J. Alfredo Cuéllar Ordaz:

Por su amistad, confianza y su atinada dirección.

Muchas gracias

Al M. en C. J. Francisco Morales Álvarez:

Por su tiempo, confianza y consejos para la elaboración de la tesis.

A mis padres:

Por todos los sacrificios que realizaron
para que pudiera llegar a donde estoy.
No tengo suficientes palabras para
agradecer todo lo que me han dado.

Los quiero mucho

A mis hermanos Carmela, Jorge, Pablo, Gabriela y David:

Por que de ellos aprendí que el trabajo y la dedicación
son la base de todo.

A mis sobrinos:

Por todos los momentos agradables.

A Lety:

Gracias por soportar las etapas pesadas
(laboratorio) de la tesis, por estar
conmigo y disfrutar los momentos
felices.

TE QUIERO MUCHO

Al M. en C. J. Alfredo Cuéllar Ordaz:

Gracias por el apoyo brindado para la realización
de esta tesis, por su amistad, confianza y
enseñanzas que me ha brindado durante estos
últimos años.

Al M. en C. J. Francisco Morales Álvarez:

Por el apoyo brindado durante los momentos
difíciles del laboratorio.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	47

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron dos inmunógenos elaborados a partir de *Pasteurella haemolytica*, uno experimental y uno comercial, para la prevención del complejo respiratorio en ovinos. La evaluación de campo se llevó a cabo en San Andrés Jaltenco, México. Se utilizaron 105 corderas, las cuales fueron sometidas a las mismas condiciones de manejo, fueron distribuidas al azar en tres grupos: grupo testigo, grupo con inmunógeno comercial y grupo con inmunógeno experimental. Los dos últimos grupos se dividieron a su vez en tres grupos de 15 animales para evaluar dosis de 2, 1.5 y 1 ml, se inmunizaron vía subcutánea y se tomaron muestras sanguíneas en los días 0, 15, 30 y 45, para obtener suero y posteriormente determinar títulos de anticuerpos contra antígenos capsulares de los serotipos A1 y A2 y títulos de anticuerpos contra leucotoxina de *P. haemolytica*, por medio de las pruebas de hemaglutinación indirecta y ensayo simple visual respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron una mejor respuesta por parte de los animales inmunizados con el producto experimental ($P < 0.05$); comportándose mejor los del grupo con dosis de 2 ml alcanzando títulos promedio de 3.3 ± 1.2 y 6.4 ± 2.4 para los serotipos A2 y A1 respectivamente, mientras tanto, los títulos máximos para el grupo experimental fueron en el grupo de 1 ml de 4.7 ± 1.2 para el serotipo A1 y en el grupo con dosis de 1.5 ml su promedio máximo fue de 2.8 ± 0.8 para el serotipo A2. El grupo testigo se comportó en las pruebas con un aumento, los títulos máximos de éste fueron de 2.5 ± 1.7 y 2.3 ± 1.0 para los serotipos A1 y A2 respectivamente ocurriendo estos en el día 45. En la prueba de ensayo simple visual, para determinar títulos de anticuerpos contra leucotoxina, los grupos tuvieron una respuesta similar, elevando sus títulos promedio hacia el día 30, con poca diferencia significativa entre ellos. Los títulos máximos para el grupo experimental fueron

de: 8.8 ± 0.8 en el día 30 para la dosis de 2 ml, 9.1 ± 0.6 en el día 45 para la dosis de 1.5 ml, 9.0 ± 0.7 en el día 30 para la dosis de 1 ml; para el grupo comercial: 10.6 ± 0.8 , 9.8 ± 1.3 , 9.7 ± 1.6 todos en el día 30 del experimento a dosis de 2, 1.5, 1 ml respectivamente y para el grupo testigo: 9.4 ± 1.1 en el día 30.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias son un problema común particularmente en regiones donde persiste el clima húmedo y caliente, temporadas de fuerte lluvia o tiempos de fríos muy prolongados que requieren el encierro nocturno de los animales ^{43, 48}. Los procesos neumónicos son considerados de suma importancia en la industria pecuaria, debido a que afectan directamente el proceso productivo de las explotaciones comerciales ^{1, 6, 10, 15, 23, 39, 41, 42, 46}.

A pesar de que los animales están constantemente expuestos a microorganismos del medio, la neumonía es un evento relativamente raro. Esto implica que los mecanismos de defensa son muy eficaces para eliminar la gran mayoría de los microorganismos, antes de que se establezcan en el tracto respiratorio y puedan causar enfermedad clínica ⁴¹.

Uno de los principales problemas infecciosos que limitan el desarrollo de la producción ovina, bovina y caprina, lo constituye el llamado complejo respiratorio. Con este nombre se da a entender que el desarrollo de neumonías en rumiantes se debe a una interacción de múltiples factores así como diferentes agentes y no solamente a un microorganismo. Dependiendo de la región geográfica en particular y del tipo de explotación serán los agentes infecciosos involucrados ^{29, 51}.

La neumonía en ovinos se considera como una de las principales causas de mortalidad perinatal con índices que varían de acuerdo con la procedencia, tipo de explotación, época del año, con cifras que fluctúan del 10 al 40%, la morbilidad puede llegar a ser del 40% ^{1, 10, 30, 51}. En ovinos en pastoreo, la enfermedad se propaga lentamente y la morbilidad es inferior a la observada en corderos concentrados en sistemas de

producción intensiva. Las cifras de mortalidad en estos animales suele ser de 5%, pero puede ascender en ocasiones entre 10 y 20 % ¹¹.

El término “pasterelosis”, se emplea para referirse a los padecimientos causados por *Pasteurella* en todas las especies animales ⁴⁸.

La pasterelosis produce grandes pérdidas en ovinos en casi todas las partes del mundo, no solo por muerte, sino también por disminución en ganancias de peso, menor eficiencia en la conversión alimenticia, costos elevados del tratamiento específico de la enfermedad en animales afectados con neumonía crónica, costos del veterinario y decomiso en el rastro, entre otros ^{10, 27, 30, 31, 41, 46, 47}.

Pasteurella haemolytica es un habitante normal y se considera como un importante oportunista del tracto respiratorio de los bovinos, ovinos y caprinos, ya que usualmente coloniza la parte alta de éste y bajo ciertas condiciones de inmunosupresión en el huésped, que suele coincidir con la aparición de brotes de la enfermedad, como: la permanencia de los animales en corrales mal ventilados o con corrientes de aire, el transporte, la desnutrición, infección primaria por virus (virus respiratorio sincicial bovino, Parainfluenza 3, Adenovirus), micoplasmas (*Mycoplasma ovipneumoniae*, *M. arginini*) o parásitos pulmonares (*Dictyocaulus filaria*, *Muellerius capillaris*, *Protostrongylus rufescens*) y el estrés, afectan los mecanismos de defensa, permitiendo el establecimiento del microorganismo y daño al tejido pulmonar, por esto la pasterelosis neumónica es considerada como un complejo respiratorio ^{1, 9, 10, 19, 25, 27, 31, 32, 40, 43, 48, 51, 52}.

Los microorganismos del género *Pasteurella* constituyen las bacterias más frecuentemente aisladas en estos procesos patológicos ^{12, 19, 37, 42}. *P. haemolytica* es una bacteria limitada casi exclusivamente a los rumiantes ^{8, 36, 50, 51}.

Entre las características generales de *P. haemolytica* se pueden mencionar que es una bacteria de forma cocobacilar que mide de 1.4 por 0.4 μm , es Gram negativa, presenta una coloración bipolar, la cual es más manifiesta con la tinción de Wright, es anaerobia facultativa, inmóvil, no forma spora, posee cápsula y es oxidasa positiva^{6, 14, 19, 43}.

La mayoría de las cepas fermentan los carbohidratos, pero producen una pequeña cantidad de ácido, no fermenta lactosa o lo hace débilmente³⁰.

En agar sangre, el crecimiento es aparente entre las 24 y 48 horas de incubación, las colonias son de tamaño variable, por lo general entre 2 y 3 mm de diámetro, grisáceas, es hemolítica e indol negativo^{6, 14, 43}.

La pasterelosis en ovinos se presenta principalmente en dos formas: una neumónica, causada por *P. haemolytica* biotipo A y otra generalizada producida por el biotipo T. Los biotipos A y T son diferenciados por su capacidad de fermentar arabinosa o trealosa respectivamente. Dentro del biotipo A se determinan los siguientes serotipos A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A11, A12, A13, A14, A16, A17 y en el biotipo T los serotipos T3, T4, T10, T15. Estos serotipos se han reconocido por hemaglutinación indirecta o mediante aglutinación rápida en placa, de acuerdo a antígenos capsulares solubles^{6, 10, 30, 36, 38, 41, 48, 52} y su distribución geográfica es variable, lo cual puede ser importante en la formulación de inmunógenos.

En ovinos el serotipo más importante es el A2, sin embargo, se han reconocido los 17 serotipos como patógenos y representan el 90% de los aislamientos. El otro 10% permanece como no tipificable y se duda de su patogenicidad^{10, 30, 41, 42, 47, 52}.

P. haemolytica produce en la fase logarítmica de crecimiento una sustancia soluble en agua que es tóxica para macrófagos y leucocitos en general, consta de una fracción

proteica, que es sensible a tripsina, es estable en presencia de oxígeno, no es dializable, 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. Es una citolisina formadora de poros y pertenece a la familia de toxinas RTX. Tiene un peso molecular de 105 kDa y es común a todos los serotipos de *P. haemolytica*^{3, 7, 16, 33, 41, 48}. La leucotoxina es estructuralmente similar a la hemolisina de *Escherichia coli* y *Actinobacillus pleuroneumoniae*^{36, 51}.

La transmisión probablemente ocurre por inhalación o ingestión de material infectado; aunque en menor grado la inhalación de bacterias al sistema respiratorio puede estimular en forma local o sistémica al tejido linfoide, esta primo-exposición puede ser explotada exitosamente en la inmunización si se utiliza los antígenos apropiados⁴¹.

En la patogénesis de la enfermedad existen múltiples interacciones huésped-bacteria, que se inicia con la inhalación del agente, la colonización nasofaríngea, la llegada al alvéolo, la respuesta a la colonización y por último culmina con la evasión bacteriana a las defensas del huésped⁵¹.

Los virus actúan como agentes primarios y facilitan la infección bacteriana, debido a que provocan un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reducen la eliminación bacteriana por el epitelio mucociliar, facilitando la adhesión y colonización por estos microorganismos, disminuyen la capacidad fagocítica del macrófago alveolar. Esto produce una disminución de la eficiencia de las células fagocíticas en el pulmón. También se menciona que otros mecanismos fagocíticos pueden estar alterados durante la infección viral, éstos incluyen: disfunción de la quimiotaxis, adhesión de partículas, ingestión fagocítica, unión fagosoma-lisosoma, muerte intracelular de bacterias, además de niveles disminuidos de enzimas lisosomales. El estrés y las infecciones virales, estimulan el crecimiento en el huésped de la actividad de elastasa en la mucosa nasal, lo cual puede

disminuir las concentraciones de fibronectina y el incremento en la adherencia de *P. haemolytica*^{41,48}. También las diferencias en cuanto a factores de virulencia entre las cepas aisladas de diversos cuadros neumónicos podrían jugar un papel determinante^{41, 51}.

La *P. haemolytica* presenta diversos factores asociados con su virulencia tales como la presencia de glicocálix, fimbria y endotoxina, proteínas de membrana externa, proteínas reguladas por hierro, antígenos aglutinantes serotipo-específico, sialoglicoproteasa, neuroaminidasa, además de la producción de una exotoxina que ha demostrado ser tóxica para los neutrófilos, macrófagos alveolares y linfocitos de rumiantes, considerados los principales mecanismos de defensa pulmonar. Con la muerte de estas células también se liberan enzimas proteolíticas, histamina y otros mediadores químicos del proceso inflamatorio que contribuyen al daño pulmonar; por estas razones, se ha considerado a la leucotoxina producida por cada uno de los 17 serotipos, como el principal factor de virulencia de la bacteria; esta exotoxina está relacionada en todos los serotipos desde el punto de vista inmunológico, funcional y genético^{7, 14, 16, 19, 22, 27, 30, 33, 36, 41, 42, 48, 50}.

Las estructuras de superficie de *P. haemolytica* responsables de la adherencia son desconocidas. Las fimbrias han sido raramente encontradas en los aislamientos de *P. haemolytica*. Los polisacaridos capsulares, el lipopolisacárido (LPS), las proteínas de la membrana externa y los antígenos aglutinantes serotipo-específico, podrían asumir el papel de adhesinas en la ausencia de fimbrias^{41, 48}.

Entre otros factores de virulencia se ha reconocido también una proteína de superficie que liga solamente transferrina de rumiantes, lo que concuerda con la especificidad de la bacteria⁴⁸.

La endotoxina es similar al LPS de otras bacterias Gram negativas, es un factor de virulencia considerado de importancia, capaz por si mismo, de generar en rumiantes una respuesta inflamatoria semejante a las lesiones de casos naturales de pasterelosis neumónica. La endotoxina es directamente tóxica al endotelio, por lo que puede incrementar la permeabilidad capilar a nivel alveolar. La endotoxina daña el endotelio mediante la estimulación del factor de necrosis tumoral y por la producción de interleucina-1 por macrófagos alveolares ⁴¹.

Otro factor de virulencia asociado con la estructura celular de *P. haemolytica* es su cápsula con propiedades antifagocíticas. Esta estructura, es de naturaleza polisacárida y le confiere a cada serotipo sus características diferenciales, asimismo, se le ha atribuido importancia como inmunógeno. Cuando el polisacárido capsular se administra a borregos es capaz de iniciar una respuesta inflamatoria discreta a nivel alveolar ⁴⁸.

Una vez que *P. haemolytica* gana el acceso al alvéolo pulmonar, factores bacterianos estimulan una respuesta inflamatoria intensa y aguda. Estos factores bacterianos asociados con los del hospedador, inducen daño tisular localizado y estimulan una respuesta sistémica asociada con el proceso inflamatorio agudo. El incremento de los eventos celulares involucra la activación de neutrófilos por *P. haemolytica* y su lugar en la inflamación pulmonar es vital para entender la patogénesis de la enfermedad causada por este organismo ^{23, 41}.

La participación de la leucotoxina en la generación de daño tisular en el pulmón ocurre a través de la activación y destrucción de neutrófilos polimorfonucleares, los macrófagos intervienen en la activación de fosfolipasas con la subsecuente liberación del factor activador plaquetario, la activación de compuestos con efectos quimiotácticos y vasoactivos derivados del ácido araquidónico, la desgranulación enzimática en los lisosomas, la

generación de radicales tóxicos del oxígeno. También, la inducción de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral, contribuyen a la formación de una respuesta inflamatoria y en consecuencia daño tisular. Asimismo, las plaquetas pueden también contribuir a liberar fibrinógeno y compuestos vasoactivos en presencia de la leucotoxina. Por otra parte, también se ha demostrado que la leucotoxina induce la liberación de histamina de las células cebadas del pulmón, lo que confirma la importancia de este mecanismo inflamatorio en el desarrollo del daño pulmonar ^{41, 48}.

Los neutrófilos, a través de los procesos inflamatorios invaden el pulmón en gran número, aumentando el grado de daño pulmonar en la enfermedad ²³.

Existen algunas explicaciones para la susceptibilidad observada en los leucocitos mononucleares. Primero los leucocitos mononucleares de rumiantes no tienen el mecanismo celular necesario para detoxificar un factor liberado por *P. haemolytica*, que las células de otras especies son capaces de neutralizar; este factor citotóxico puede actuar en rumiantes por una ruta metabólica que falte en los no rumiantes. Segundo, si la muerte celular causa el daño en la membrana lisosomal, los leucocitos mononucleares de rumiante pueden poseer una membrana con sitios de recepción para la citotoxina que falte en las células de no rumiante ³⁶.

Los efectos citotóxicos de *P. haemolytica* en el macrófago alveolar, pueden también contribuir con la severidad de daño pulmonar, al tener los macrófagos factores de descarga que causan irritación y deposición de fibrina. Además, la habilidad de las bacterias para debilitar al macrófago y linfocitos puede ser importante en la iniciación de la enfermedad ³⁶.

Las investigaciones sobre la hemolisina de *P. haemolytica* han sido escasas, a pesar que este factor le confiere a la bacteria su nombre, sin embargo su actividad hemolítica es

reducida. La producción de hemolisina no está mediada por plásmidos, sin embargo, no se ha identificado el gen que le confiere a la bacteria su actividad hemolítica. Investigaciones sobre el papel de la leucotoxina demostraron que este factor es capaz de provocar destrucción de eritrocitos de rumiantes y también de conejos. Por lo que la leucotoxina misma puede ser el factor responsable del efecto hemolítico. Es probable que el papel patológico de la hemolisina sea el de obtener hierro de los tejidos lesionados ⁴⁸.

Cepas mutantes que no producen leucotoxina pueden inducir lesiones en pulmón, esta característica resalta la importancia de otros factores de virulencia en la patogénesis de la enfermedad ⁴¹.

Los signos de la enfermedad respiratoria aguda se presentan en corderos de pocas semanas de edad, o bien corderos después del destete y que son transportados a otras explotaciones para someterlos a un sistema intensivo de producción. En los corderos de corta edad, uno de los principales factores predisponentes para el desarrollo de neumonía puede ser el no haber ingerido cantidades suficientes del calostro ^{46, 51}.

Aquellos animales que desarrollan neumonía por interacciones virus-bacteria pueden no mostrar signos clínicos y simplemente encontrarse muertos durante la inspección matutina o pueden desarrollar un proceso crónico. En grupos de corderos pueden persistir estas muertes súbitas durante todo el brote. El número de animales muertos tiende a incrementarse en los días siguientes ^{11, 51}.

El cordero enfermo de pastorellosis presentará con frecuencia tos, dificultad respiratoria que puede acentuarse durante la marcha, fiebre, muestra la cabeza y orejas bajas, rehusa comer, pierde peso progresivamente y se aparta del rebaño. A medida que avanza el brote se hace más evidente la dificultad respiratoria en el proceso y se observa entre otros signos, disnea, espuma en la boca, tos, descarga nasal y conjuntival. A la auscultación se escucha

estertores húmedos y roce pleural. La muerte puede sobrevenir en unas doce horas a partir de la aparición de los primeros signos de enfermedad, pero en la mayor parte de los casos no ocurre sino hasta pasados tres días ^{11, 51}.

En ovinos que han muerto por pasterelosis neumónica aguda, se puede observar una pleuroneumonía fibrinosa aguda. Se encuentra exudado gelatinoso grisáceo sobre el pericardio y grandes cantidades de exudado pleural de color pajizo, mientras que los pulmones están agrandados, edematosos y hemorrágicos, debido a la entrada de neutrófilos, deposición de fibrina en alvéolos, trombosis capilar y formación de poros ^{1, 3, 7, 11, 22, 23, 41}.

Las lesiones macroscópicas se encuentran confinadas al aparato respiratorio, con áreas craneoventrales de consolidación, que fluctúa por lo general de un 10 a un 60% de la superficie pulmonar. Durante la etapa inicial de la neumonía, la zona afectada se encuentra congestionada, firme, de aspecto brillante, pesada y con exudado seroso o serofibrinoso en tórax y pericardio. Conforme la infección progresa, el pulmón va tornándose de un color rojo a uno grisáceo, de consistencia firme y con abundante exudado fibrinoso que puede producir adherencia entre la pleura parietal y visceral. De aquí en adelante pueden ocurrir dos eventos: resolución o cronicidad del caso. En la primera instancia, el tejido vuelve a adquirir su color rosáceo, flexible y paulatinamente se recupera la capacidad de aereación. Si la infección persiste en forma activa se pueden producir adherencias crónicas, bronquiectasia, o bien producirse el desarrollo de abscesos multifocales. Los linfonodos bronquiales y mediastínicos se encuentran aumentados de tamaño, congestionados, edematosos y a veces hemorrágicos ^{9, 18, 51}.

Al examen microscópico (histopatología), se observa una neumonía exudativa intersticial (neumonía fibrinosa) caracterizada por un área central de alvéolos congestionados con

edema y fibrina en los espacios alveolares, acompañados de masas de células mononucleares inflamatorias. Las paredes alveolares pueden sufrir necrosis. En ovinos que sobreviven a la fase aguda de la enfermedad se puede observar la transformación de neutrófilos, dando un aspecto arremolinado (células avenulares), alrededor de los alvéolos necrosados, esto podría ser ocasionado por las propiedades de la leucotoxina ^{11,51}.

En el tejido conjuntivo interlobulillar y subpleural, los vasos linfáticos se encuentran dilatados debido a la acumulación de fluido edematoso y fibrina. Una banda de células inflamatorias delimita la unión de los septos interlobulillares, el tejido conjuntivo subpleural y del tejido conjuntivo alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos, del área central de congestión y necrosis. Se puede apreciar trombosis de arteriolas pulmonares y vénulas en las zonas afectadas ⁵¹.

El diagnóstico de este complejo respiratorio, debe incluir aspectos clínicos, patológicos, serológicos y microbiológicos ⁴⁸.

Es recomendable recolectar y enviar muestras de pulmón para intentar el aislamiento de virus y bacterias, de aquellos animales que han muerto con signos de enfermedad respiratoria y que tienen lesiones en pulmón. El aislamiento de bacterias como *P. haemolytica* es útil para establecer su biotipo y su serotipo correspondiente, con lo cual se puede determinar que serotipos predominan en la zona geográfica en cuestión. Sin embargo, la serotipificación de *P. haemolytica* no es rutinaria debido al tiempo y costo que involucra. Con referencia al estudio virológico, pocos laboratorios en México realizan este tipo de actividad diagnóstica ^{47,51}.

De no ser posible el aislamiento de virus, es recomendable tomar muestras de suero de los animales afectados para determinar mediante pruebas como virus-

neutralización, los títulos existentes de anticuerpos neutralizantes contra los virus respiratorios más comunes ⁵¹.

La presencia de títulos de anticuerpos altos a *P. haemolytica* en el ganado puede ser indicativa de una infección activa, enfermedad clínica o recuperación subsecuente ^{12, 45}.

Entre los agentes infecciosos aislados en las enfermedades respiratorias de ovinos se mencionan como importantes: *Mycoplasma ovipneumoniae*, *M. arginini*, *P. haemolytica*, adenovirus, virus de Parainfluenza 3 y virus respiratorio sincicial bovino, así como, *Dictyocaulus filaria*, *Muellerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens* ^{10, 25, 27, 40}.

En los animales enfermos de neumonía, se puede observar un aumento en los valores de cuenta de eritrocitos totales, hemoglobina y volumen celular, también es posible encontrar neutrofilia con linfopenia, valores bioquímicos dentro de los normales. La citología del líquido de la red bronquioalveolar, revela un aumento en el número de neutrófilos con disminución correspondiente en linfocitos ³⁷.

La elección de antibióticos, dependerá de la economía y el éxito esperado con un producto particular en determinada región. Cada animal clínicamente enfermo deberá ser tratado por separado. La duración del tratamiento dependerá de la gravedad de cada caso, la respuesta lograda en los primeros días, el valor económico del animal, así como el grado de complicaciones que pudieran ocurrir (como pleuresía, abscesos pulmonares y bronquiectasia) ¹¹.

En ocasiones basta un tratamiento con antibiótico, lo que resulta más económico para la mayor parte de los casos, pero los animales gravemente afectados o aquellos que recaen requieren un tratamiento diario por 3 a 5 días. En los corrales donde existen grandes cantidades de animales un paso importante es identificar con oportunidad los animales

enfermos. Estos deberán ser separados de los demás, examinados, tratados, identificados y colocados en un corral aparte hasta que se recuperen ¹¹.

La utilización de antibióticos en combinación reduce la resistencia microbiana, por ejemplo sulfonamida-trimetoprim con una dosis de 66-99 mg/kg y 33-50 mg/kg respectivamente ⁴, eritromicina-oxitetraciclina con dosis de 15 mg/kg y 20 mg/kg respectivamente ¹², penicilina-dihidroestreptomicina con dosis de 20000 a 30000 U.I./kg y 20 mg/kg respectivamente. En la medicación masiva se puede utilizar sulfametacina 100 mg/kg en agua de bebida por 5 a 7 días, oxitetraciclina de 3 a 5 mg/kg en el alimento durante 7 días ¹¹.

El macrólido tilcomisin es eficaz contra *Pasteurella* y *Mycoplasma*, a una dosis de 20 mg/kg de peso vivo, produciendo niveles terapéuticos durante 3 ó 4 días en el pulmón ³¹.

Se recomienda el uso de corticosteroides como tratamiento auxiliar en los casos graves de pasterelosis neumónica. La razón para su uso es su efecto desinflamatorio. La dexametasona en un tratamiento específico se usa a razón de 1 mg/5 kg sin efectos adversos evidentes ¹¹.

Aunque la inmunización ha tenido un impacto importante en reducir pérdidas económicas debido a las enfermedades infecciosas, la tecnología de la vacunación no ha cambiado durante los últimos años. Sin embargo, con la llegada de la biotecnología y la comprensión de factores de virulencia de agentes infecciosos, combinado con el conocimiento de la respuesta inmune, se ha creado una revolución en el número de nuevos agentes que pueden ser controlados potencialmente por inmunización ⁵.

Los avances en biología molecular, bioquímica, inmunología y áreas afines han producido el desarrollo de muchas nuevas vacunas, así como la de mejorar las que ya existen. La disponibilidad creciente de estos inmunógenos, está proporcionando la oportunidad para

prevenir enfermedades infecciosas serias en grupos de edad diferentes y reducir la morbilidad y mortalidad ²⁶.

La prevención de pasteurelisis neumónica por inmunización se ha intentado durante muchos años. Con respecto al uso de las bacterinas se ha discutido mucho acerca de la protección que brindan, debido a que en la mayoría de las veces se concluye que confieren escasa protección e incluso se menciona que pueden incrementar el daño pulmonar ^{9, 12, 13, 32, 45, 49, 50}.

A pesar de lo anterior, en México se siguen utilizando las bacterinas, sin saber a ciencia cierta su eficacia, serotipos utilizados y las características de las cepas contenidas ^{1, 18, 41, 44}.

Existen varias bacterinas de *P. haemolytica* en el mercado, sin embargo, la mayoría se limita a *P. haemolytica* serotipo A1. Actualmente se han desarrollado diversos inmunógenos para prevenir las neumonías por *P. haemolytica* en los rumiantes con resultados aparentemente satisfactorios, en algunos casos, utilizando como antígenos: bacterias vivas, bacterias muertas, material capsular, extractos bacterianos y leucotoxina cruda, además de probar rutas de administración como la oral y el uso de adyuvantes sintéticos ^{1, 15, 47}.

Se han utilizado varias vacunas experimentales y comerciales de *P. haemolytica*, en un esfuerzo por reducir la incidencia de la enfermedad; estos resultados sugieren que las vacunas vivas son las más eficaces. Esta protección se considera que es debido a la producción *in vivo* de factores de virulencia importantes y antígenos, como leucotoxina y los componentes capsulares ⁴⁴. Sin embargo el médico de campo y los productores se resisten a utilizarlos por los posibles efectos colaterales y su costo elevado.

Los inmunógenos a partir de bacterias vivas de cultivos de seis horas, son los que han dado resultado más satisfactorios. Se argumenta que este tipo de biológicos son eficaces porque

los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico (material capsular, leucotoxina 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 ⁴².

Los sobrenadantes de cultivo de *P. haemolytica* contienen cantidades importantes de leucotoxina y otros antígenos; éstos producen buena inmunidad previniendo los problemas respiratorios, es un excelente inmunógeno y es necesario evaluarlo bajo distintas condiciones. Sin embargo, es importante mencionar que los anticuerpos exclusivos contra leucotoxina, no son suficientes para conferir inmunidad ^{1, 15, 17, 44}.

Los inmunógenos que contienen varios serotipos de *P. haemolytica* estimulan la producción de anticuerpos en ovejas preñadas; de este modo los corderos reciben anticuerpos del calostro, lo cual interfiere con la producción de anticuerpos en los corderos, si éstos son vacunados a edad temprana ¹. La deficiente respuesta y función de células fagocíticas del cordero, se debe a que éste madura después de cinco semanas de edad. Ocurriendo casos en el campo, donde se puede presentar cuadros de pasterelosis natural en corderos mayores de dos meses generalmente de forma septicémica ^{35, 51}.

Las “nuevas” vacunas, han mostrado buenos niveles de protección en pruebas de laboratorio, pero pocas pruebas de campo se han podido llevar a cabo ⁹.

Es reconocido que la inmunización es el mejor método para el control de la pasterelosis y las investigaciones se han concentrado en la identificación y caracterización de inmunógenos potencialmente protectivos en cepas de origen ovino. El requisito esencial para medir inmunidad protectora es contar con un sistema real y relevante para reproducir el cuadro en el animal, aunque esto no es fácil ⁴¹.

El desarrollo de inmunógenos en México permite conocer las cepas nacionales y serotipos más comunes de acuerdo a las zonas geográficas y disminuir los costos de producción.

En México recientemente se están introduciendo inmunógenos que son indicados para bovinos y se han empezado a utilizar en borregos, sin haber sido previamente evaluados, obviamente el costo es elevado. No se tienen datos en cuanto a dosis y no se sabe si tienen capacidad protectora. Esto se debe a que los laboratorios nacionales que producen biológicos solo producen bacterinas que son poco eficaces para prevenir la pastereosis neumónica.

OBJETIVOS

Objetivo general.

- Evaluar a nivel de campo la respuesta serológica de dos inmunógenos, uno comercial (bacterina-toxoide) y uno experimental (sobrenadante de cultivo, células completas inactivadas), contra *Pasteurella haemolytica* en ovinos; así como evaluar diferentes dosis preventivas.

Objetivos particulares.

- Determinar anticuerpos contra antígenos capsulares del serotipo A1 y A2 de *P. haemolytica*; en suero de ovinos inmunizados contra la pastereiosis neumónica.
- Determinar anticuerpos contra la leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*, en suero de ovinos inmunizados contra la pastereiosis neumónica.
- Determinar la mejor respuesta a la inmunización con diferentes dosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron 105 corderas F1 (Merino-Dorset y Merino-Suffolk) de origen australiano, entre cinco y seis meses de edad, clínicamente sanas, confinadas en corrales con piso de tierra y techos de lámina, con una alimentación de mantenimiento (paja de avena y alimento comercial) y agua *ad libitum*. La explotación se encuentra ubicada en San Andrés Jalisco, México.

Diseño experimental. Los animales se seleccionaron al azar para formar 7 grupos de 15 animales para evaluar dos inmunógenos a tres diferentes dosis y tener un grupo testigo. A todas las corderas se les tomó muestra de sangre, mediante venopunción yugular utilizando tubos vacutainer con heparina como anticoagulante, al día 0, 15, 30 y 45 después de haber sido inmunizados, para obtener suero, y determinar títulos de anticuerpos contra antígenos capsulares y contra leucotoxina de *P. haemolytica* mediante las técnicas de hemaglutinación indirecta y ensayo simple visual respectivamente.

Los animales quedaron distribuidos de la siguiente forma:

GRUPO	INMUNÓGENO	DOSIS	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
1	EXPERIMENTAL	2.0 ml	SC**
2	EXPERIMENTAL	1.5 ml	SC
3	EXPERIMENTAL	1.0 ml	SC
4	COMERCIAL	2.0 ml	SC
5	COMERCIAL	1.5 ml	SC
6	COMERCIAL	1.0 ml	SC
7	TESTIGO*	2.0 ml	SC

*Solución salina fisiológica, **subcutánea

Inmunógeno comercial (*One-Shot*): Es una bacterina-toxoide para vacunar bovinos sanos y previene la pasteurelosis neumónica causada por *P. haemolytica* tipo A1. Contiene

bacterias completas muertas del serotipo A1 y un compuesto antigénicamente similar a la leucotoxina, denominado leucotoxide. Es un producto inactivado, contiene un diluyente estéril con un adyuvante para incrementar la respuesta inmune.

Inmunógeno experimental: elaborado en el CENID-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en el proyecto “Complejo respiratorio de rumiantes”. Es una bacterina-leucotoxina para vacunar ovinos sanos y previene la pasteurelosis neumónica causada por *P. haemolytica*. Contiene bacterias completas muertas de los serotipos A1 y A2 y un sobrenadante de cultivo rico en leucotoxina y otros antígenos de *P. haemolytica* (con una masa antigénica de 1×10^9 UFC/ml). El sobrenadante se obtiene por cultivo de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1 y A2 hasta su fase de crecimiento logarítmico en medio RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino. Este sobrenadante es evaluado para determinar su efecto citotóxico y para determinar la presencia otros antígenos potencialmente protectivos. Se utilizan cepas de origen ovino para su elaboración.

Hemaglutinación indirecta para la determinación de anticuerpos contra antígenos capsulares de *P. haemolytica*.

1. **Obtención de eritrocitos.** Se tomaron muestras de sangre periférica de ovinos con tubos vacutainer, los cuales contenían heparina como anticoagulante, posteriormente se centrifugaron a 800 xg por 5 minutos, el sobrenadante se decantó, el paquete celular se resuspendió en solución salina balanceada (SSB) 1x y se repitió el mismo procedimiento de centrifugar y resuspender en dos ocasiones más para eliminar elementos plasmáticos.

2. Elaboración de antígeno. Se cultivó la bacteria, *Pasteurella haemolytica* serotipo A1 y A2 por separado, en 300 ml de medio caldo infusión cerebro corazón (BHI) durante 18 horas a 37° C, en baño María con movimiento constante. Posteriormente se inactivó a 56° C por 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron eritrocitos de ovino a una concentración del 1%, se incubó en baño María durante una hora a 37° C. Una vez concluido el tiempo de sensibilización, el contenido de los matraces se centrifugó a 800 xg durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el paquete con SSB 1x por tres ocasiones, el paquete celular se resuspendió en SSB 1x. Para conservar se agregó formol a una concentración final de 0.3%.

3. Determinación de anticuerpos de antígenos capsulares. En placas de microtitulación de 96 pozos en forma de "U" se agregaron 25 µl de SSB 1x en todos los pozos; en el primer pozo de cada fila se agregó 25 µl de suero problema. Se hicieron diluciones dobles de los sueros hasta la fila "H". Posteriormente se agregaron 25 µl de eritrocitos sensibilizados con *P. haemolytica* del serotipo a probar (A1 ó A2). Se dejó reposar durante dos horas y se realizó la lectura.

Un fondo con un punto rojo en el centro del pozo indica que no hay presencia de anticuerpos anticápsula en el suero.

Un fondo con una corona en el centro del pozo, indica aglutinación de los eritrocitos sensibilizados y por lo tanto presencia de anticuerpos anticápsula con capacidad hemoaglutinante en el suero.

Para esta prueba se utilizaron sueros controles positivos y negativos como referencia.

Ensayo simple visual para la determinación de anticuerpos contra la leucotoxina de *P. haemolytica*.

1. **Obtención de leucotoxina para la prueba simple visual.** Se sembraron cepas de *P. haemolytica* serotipo A1 y A2 en agar sangre y fueron incubadas a 37° C durante 18 horas. Se procedió a cosechar y cultivar en matraces que contenían 250 ml de medio RPMI 1640 adicionado con 7% de suero fetal bovino. Se incubó, para favorecer la multiplicación de la bacteria en baño María a 37° C con movimiento constante durante cinco a seis horas, donde la bacteria alcanza su fase de crecimiento logarítmico detectado por un cambio de color del medio el cual se torna amarillo y con una apariencia turbia. Se centrifugó a 1500 xg por 20 minutos, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en un medio fresco para una segunda incubación de una a dos horas a 37° C en baño María con movimiento constante. Posteriormente se centrifugó para obtener el sobrenadante del cual se obtuvieron alícuotas para determinar su efecto citotóxico por medio de ensayo simple visual (titulación).

2. **Choque hipotónico para la obtención de leucocitos de sangre periférica de ovinos.** Se tomaron muestras de sangre periférica de ovino con tubos vacutainer, los cuales, contenían heparina como anticoagulante. La sangre se depositó en tubos de polipropileno de 50 ml a los cuales se les adicionó la misma cantidad de agua destilada por 30 segundos, provocando el choque hipotónico que produce la lisis de los eritrocitos. Posteriormente, se le agregó la misma cantidad de SSB 2x, con lo cual se detuvo la lisis eritrocítica. Se centrifugó a 800 xg. durante 5 minutos. Este procedimiento se realizó hasta obtener el paquete celular blanco, libre de eritrocitos. El paquete celular blanco se resuspendió en medio RPMI 1640 a una concentración de 1×10^6 células/ml.

3. Titulación de leucotoxina. En placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano se agregaron 100 µl de RPMI 1640 a todos los pozos y se agregaron 100 µl de sobrenadante de los cultivos de *P. haemolytica* a la primera fila de pozos. Se realizaron diluciones dobles, pasando 100 µl de la fila "A" a la "B" y de la "B" a la "C" y así sucesivamente hasta la fila "H"; se agregaron 100 µl de leucocitos obtenidos por choque hipotónico y se incubó por una hora a 37° C. Posteriormente se centrifugó la placa a 800 xg durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante, se adicionó formalina al 10% a todos los pozos de la placa, para fijar las células y a los 20 minutos se agregó cristal violeta al 1% y 5 minutos después se realizó la lectura previo lavado de las placas.

Un fondo claro en los pozos indica la presencia de leucotoxina la cual ejerce su actividad lítica sobre los leucocitos eliminando el sustrato celular a teñir.

Un fondo de color azul indica la presencia de células y por lo tanto la ausencia de leucotoxina o el efecto de dilución de la misma.

4. Determinación de anticuerpos contra la leucotoxina de *P. haemolytica*. Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tiene la leucotoxina de *P. haemolytica* para lisar a las células "blanco" y la capacidad de los anticuerpos presentes en el suero de los animales para inhibir este efecto citotóxico.

Se agregaron 192 µl de RPMI 1640 en microplacas de titulación de 96 pozos de fondo plano y 8 µl de suero problema fueron depositados en la primera fila, para iniciar con una dilución de 1:25, se realizaron diluciones dobles del suero, se agregaron 100 µl de leucotoxina ya titulada (título 1:2), y se adicionaron 100 µl de células (leucocitos) a todos los pozos. Se dejó incubar una hora a 37° C y se centrifugó a 800 G durante 5 minutos, se

decantó el sobrenadante y se agregó formalina al 10% para fijar las células, pasados 20 minutos se agregó cristal violeta al 1% y después de 5 minutos se realizó la lectura de los resultados previo lavado de las placas.

Un fondo claro indicará la ausencia de anticuerpos, por lo que la leucotoxina queda libre ejerciendo su efecto de lisis sobre las células “blanco” eliminando el sustrato celular a teñir.

Un fondo de color azul indica la presencia de anticuerpos neutralizantes de leucotoxina en suero.

Para cada ensayo se utilizaron sueros controles positivos y negativos como referencia.

Análisis estadístico. Se analizaron las variables: niveles de anticuerpos contra antígenos capsulares y leucotoxina con una análisis de varianza con un diseño en arreglo factorial anidado con rompimiento en tiempo. Los títulos serológicos se expresan logarítmicamente en base 2 para facilitar la interpretación de los datos y análisis.

RESULTADOS

Desde el inicio del trabajo el suero obtenido de los corderos antes de la inmunización, presentó anticuerpos contra *Pasteurella haemolytica* desde un principio.

En el grupo de corderos inmunizados con el biológico experimental, los títulos de anticuerpos contra el serotipo A1 de *P. haemolytica* (Fig. 1) se puede notar un aumento gradual en los cuatro muestreos (días 0, 15, 30 y 45). Se observa que los animales tratados con dosis de 2 ml alcanzan su máximo título en el día 45 siendo éste de 6.4 ± 2.4 , los otros dos grupos tratados aumentan sus títulos de anticuerpos aunque no de manera tan significativa como el primer grupo, la dosis de 1.5 ml en el día 45 alcanza su promedio máximo de títulos que fue de 3.9 ± 2.2 y la dosis de 1 ml alcanza el título máximo en el día 15 con 3.0 ± 1.1 .

En la Fig. 2, se muestran los resultados obtenidos con los animales inmunizados con el biológico comercial, donde se observa que también hay un aumento en los títulos, pero no es tan importante como en la figura anterior, la dosis de 2 ml tuvo su máximo de títulos en el día 30 alcanzando 3.1 ± 1.5 , la dosis de 1.5 ml tuvo un comportamiento de meseta alcanzando niveles de 2.9 ± 1.5 y 2.8 ± 1.2 en los días 15 y 30 respectivamente. Los títulos alcanzados con la dosis de 1 ml fue mayor a las dosis de 2 y 1.5 ml alcanzando su máximo nivel en el día 15 que es de 4.7 ± 1.2 y se observa una caída brusca hacia los días 30 y 45.

En las figuras 3, 4 y 5, se presentan las comparaciones entre las dosis utilizadas de los grupos experimental y comercial, se puede observar que los animales del grupo con vacuna experimental con dosis de 2 ml tuvieron mayor respuesta ($P < 0.05$), los animales vacunados con 1.5 ml se comportaron de forma similar ($P > 0.05$) durante los días 0, 15 y 30 y solo hacia el día 45 los anticuerpos contra antígenos capsulares aumentó sus niveles, sin

embargo, la dosis de 1 ml con inmunógeno comercial tuvo mejor respuesta que el grupo experimental durante los días 15 y 30 ($P < 0.05$).

En la Fig. 6 se puede observar el comportamiento correspondiente de los anticuerpos contra antígenos capsulares del serotipo A2 de *P. haemolytica* del grupo de animales tratados con el inmunógeno experimental, se representa como en la Fig. 1, un aumento en los títulos desde el día 15, donde la dosis de 2 ml alcanza su nivel máximo en el día 30 con títulos de 3.3 ± 1.2 con una posterior disminución. La dosis de 1.5 ml tuvo su mejor respuesta al día 15 con títulos de 3.0 ± 1.2 , la cual disminuye drásticamente en los días 30 y 45, obteniendo títulos similares al grupo de 1 ml y al testigo. La dosis de 1 ml tuvo un comportamiento ascendente pero no importante.

En la Fig. 7, se observa el grupo tratado con el inmunógeno comercial donde los animales vacunados con la dosis de 2 ml no elevaron los títulos de anticuerpos contra antígenos capsulares de manera importante, durante todos los muestreos, comportándose más bien como una meseta, la dosis de 1.5 ml tuvo la mejor respuesta en este grupo con títulos de 2.8 ± 0.8 en el día 15, teniendo posteriormente una disminución hasta títulos de 1.6 ± 0.6 ; la dosis de 1 ml también tuvo una elevación hacia el día 15 con títulos de 2.2 ± 1.1 y comportándose de la misma forma que la dosis de 1.5 ml.

La Fig. 8, 9 y 10, contienen las gráficas comparativas de las dosis entre los grupos experimental y comercial. Se puede observar que los títulos en el grupo con dosis de 2 ml ($P < 0.05$), el grupo experimental tuvo mayor respuesta (Fig. 8), la dosis de 1.5 ml se comporta de manera similar ($P > 0.05$), en los dos grupos, durante todos los muestreos (Fig. 9) y la dosis de 1 ml del grupo comercial fue mayor ($P < 0.05$) en sus títulos (Fig. 10).

Los títulos contra la leucotoxina de *P. haemolytica* observados en la Fig. 11 con los animales inmunizados con el biológico experimental tuvieron buenos resultados alcanzando

su nivel máximo al día 30 con títulos de 8.8 ± 0.8 con dosis de 2 ml, 9.1 ± 0.6 , con dosis de 1.5 ml y 9.0 ± 0.7 para la dosis de 1 ml, aunque no se hayan mostrado diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre los grupos.

En la Fig. 12, se observa el promedio máximo de títulos alcanzados por el grupo comercial, en este caso, también se presentó en el día 30 con 10.6 ± 0.8 para la dosis de 2 ml, 9.8 ± 1.3 dosis de 1.5 ml y 9.7 ± 1.6 dosis de 1 ml. La diferencia estadística no fue significativa ($P > 0.05$) entre los grupos.

En el cuadro 1 se puede observar el promedio de los títulos de las pruebas realizadas para la evaluación de los inmunógenos contra *P. haemolytica*.

Cabe mencionar que durante la fase de evaluación se observaron dos casos de problemas respiratorios clínicos en animales del grupo testigo, uno se resolvió favorablemente con tratamiento convencional y el otro caso concluyó en muerte observándose lesiones neumónicas a la necropsia.

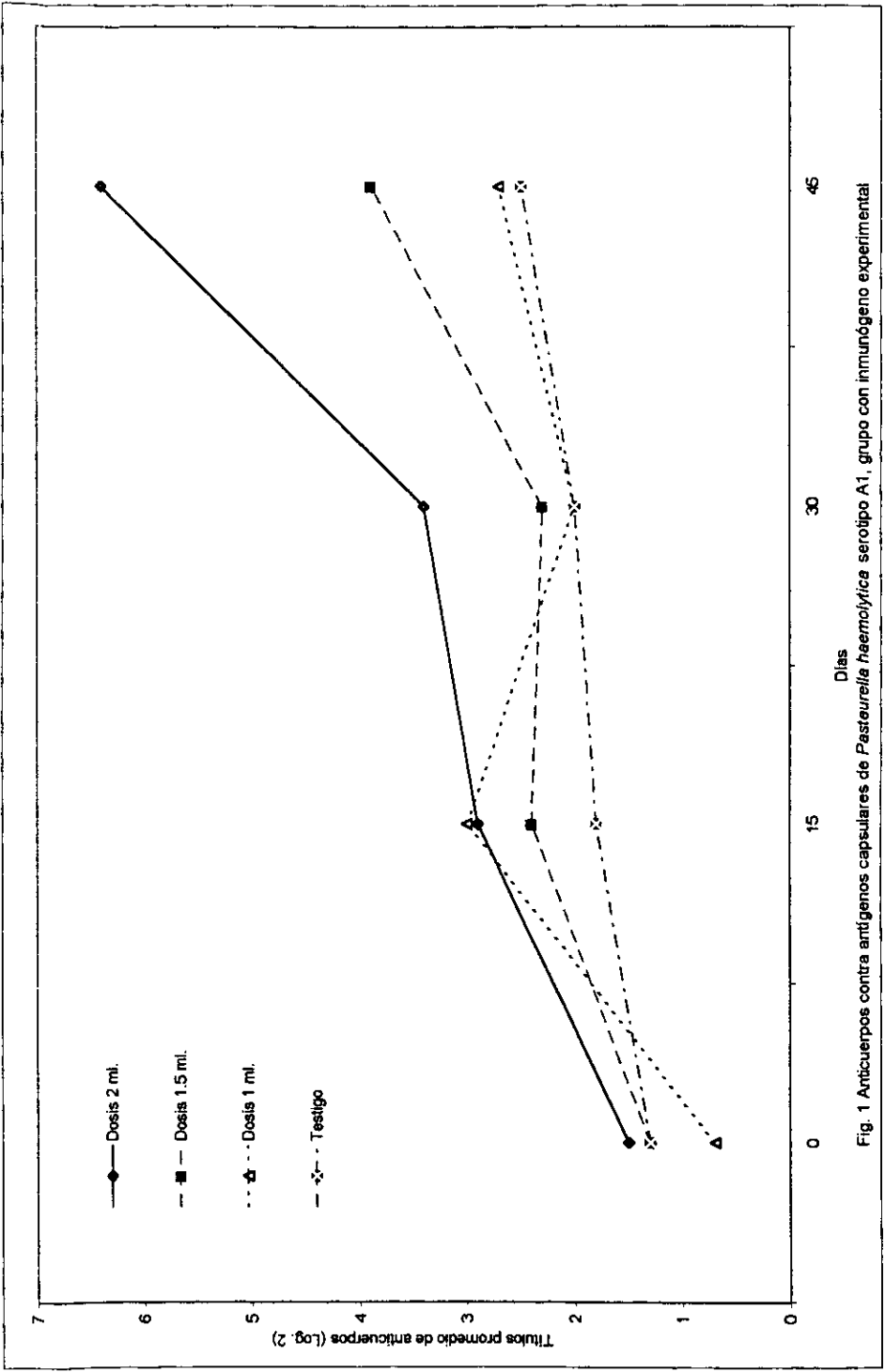


Fig. 1 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1, grupo con inmunógeno experimental

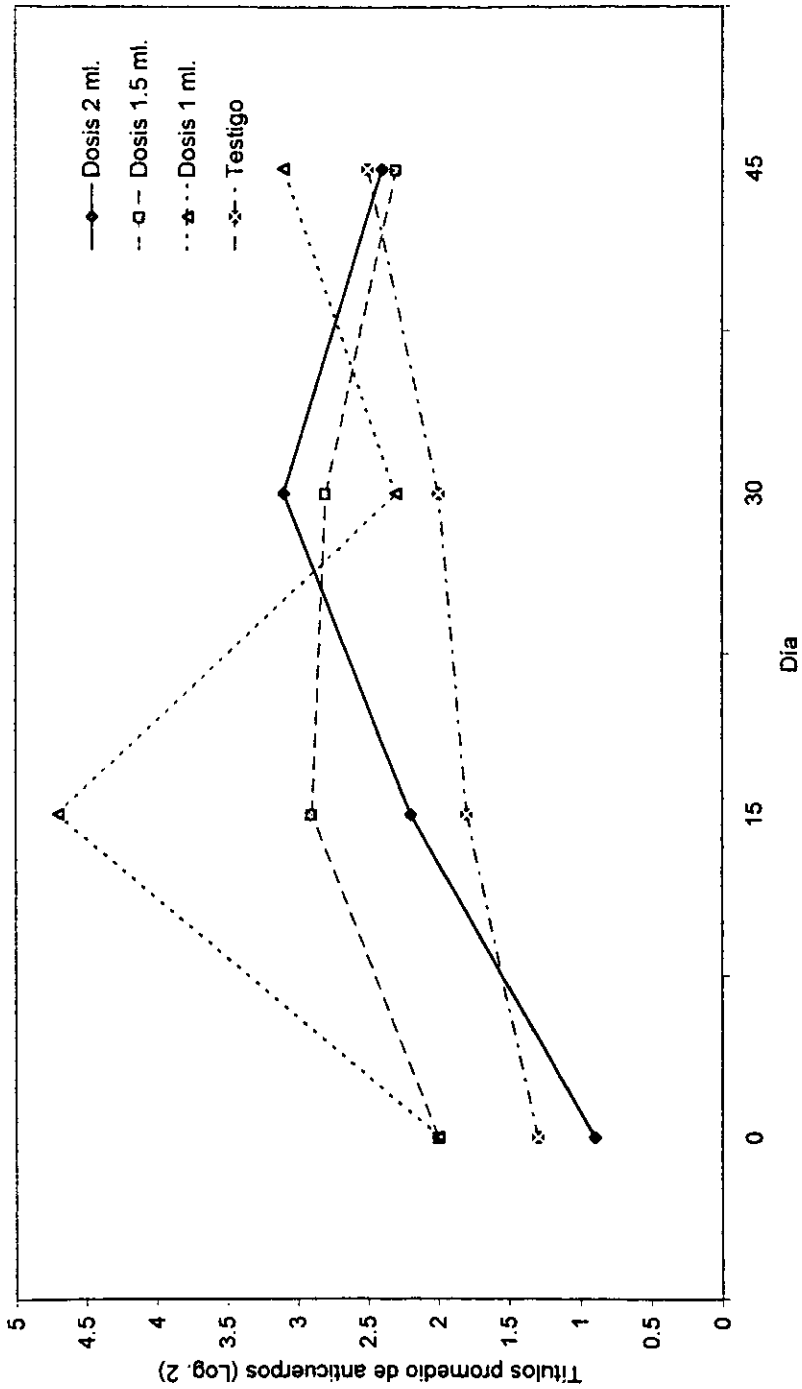


Fig. 2 anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1, grupo con inmunógeno comercial

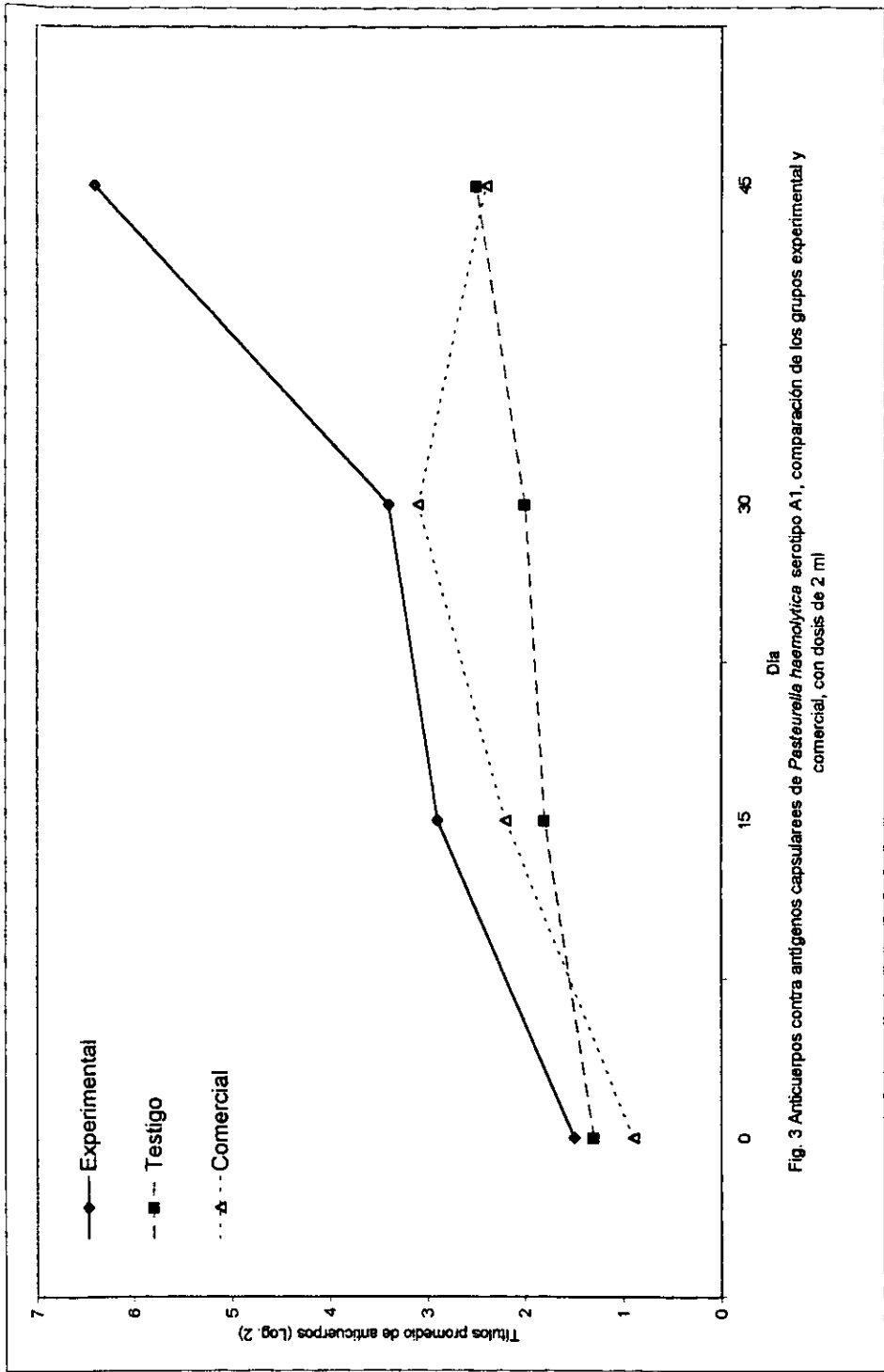


Fig. 3 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1, comparación de los grupos experimental y comercial, con dosis de 2 ml

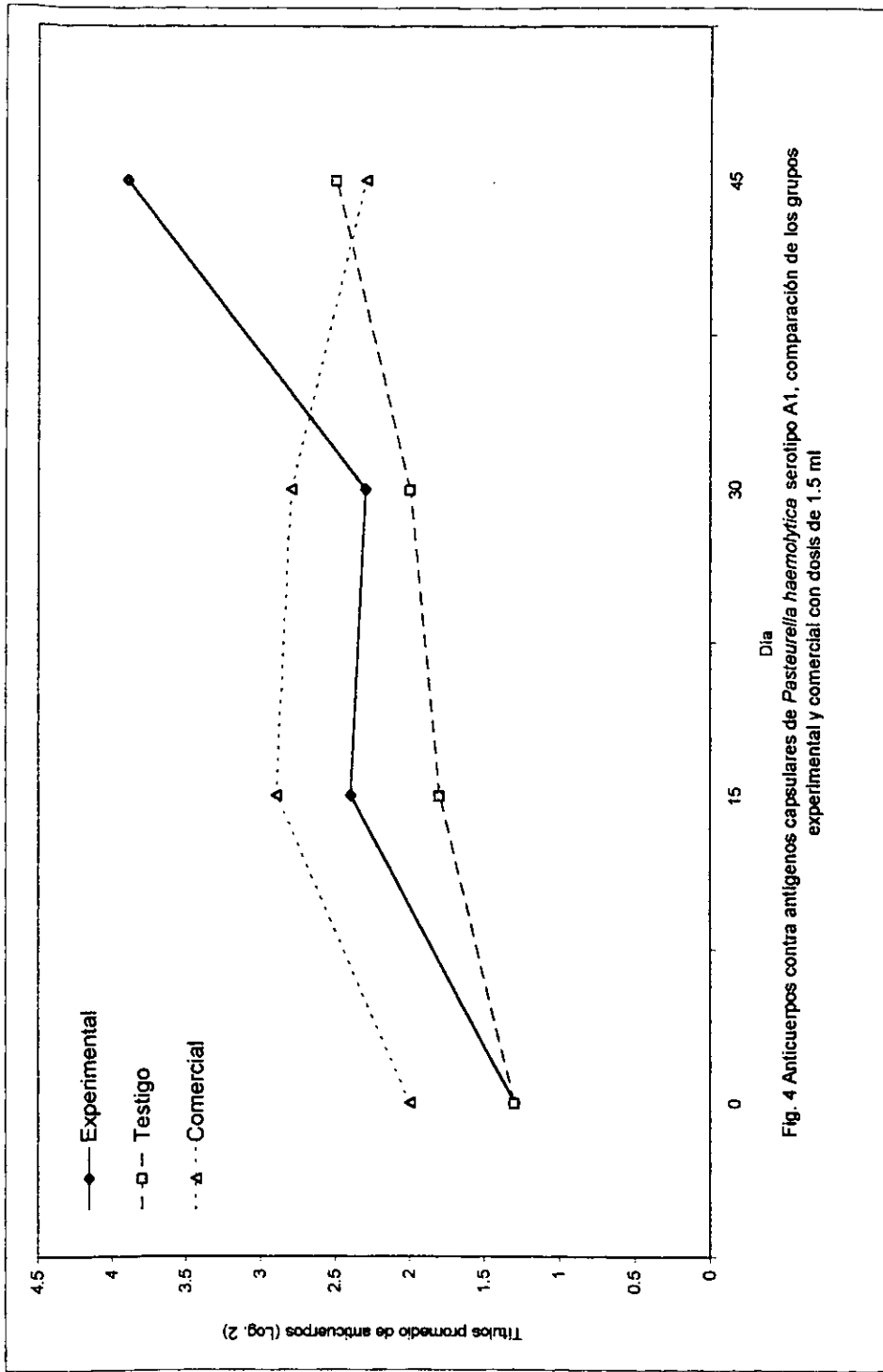


Fig. 4 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1. comparación de los grupos experimental y comercial con dosis de 1.5 ml

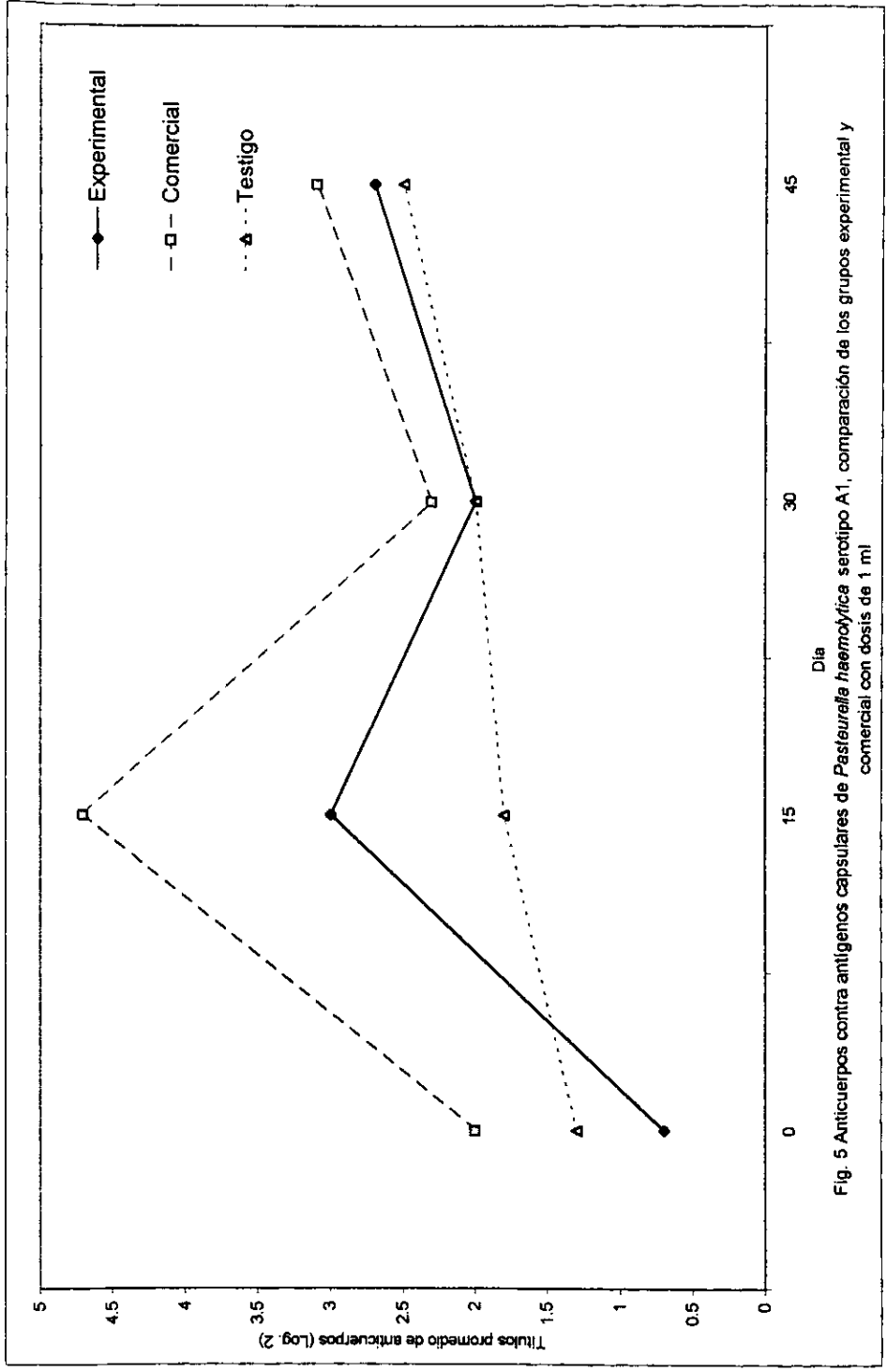


Fig. 5 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1, comparación de los grupos experimental y comercial con dosis de 1 ml

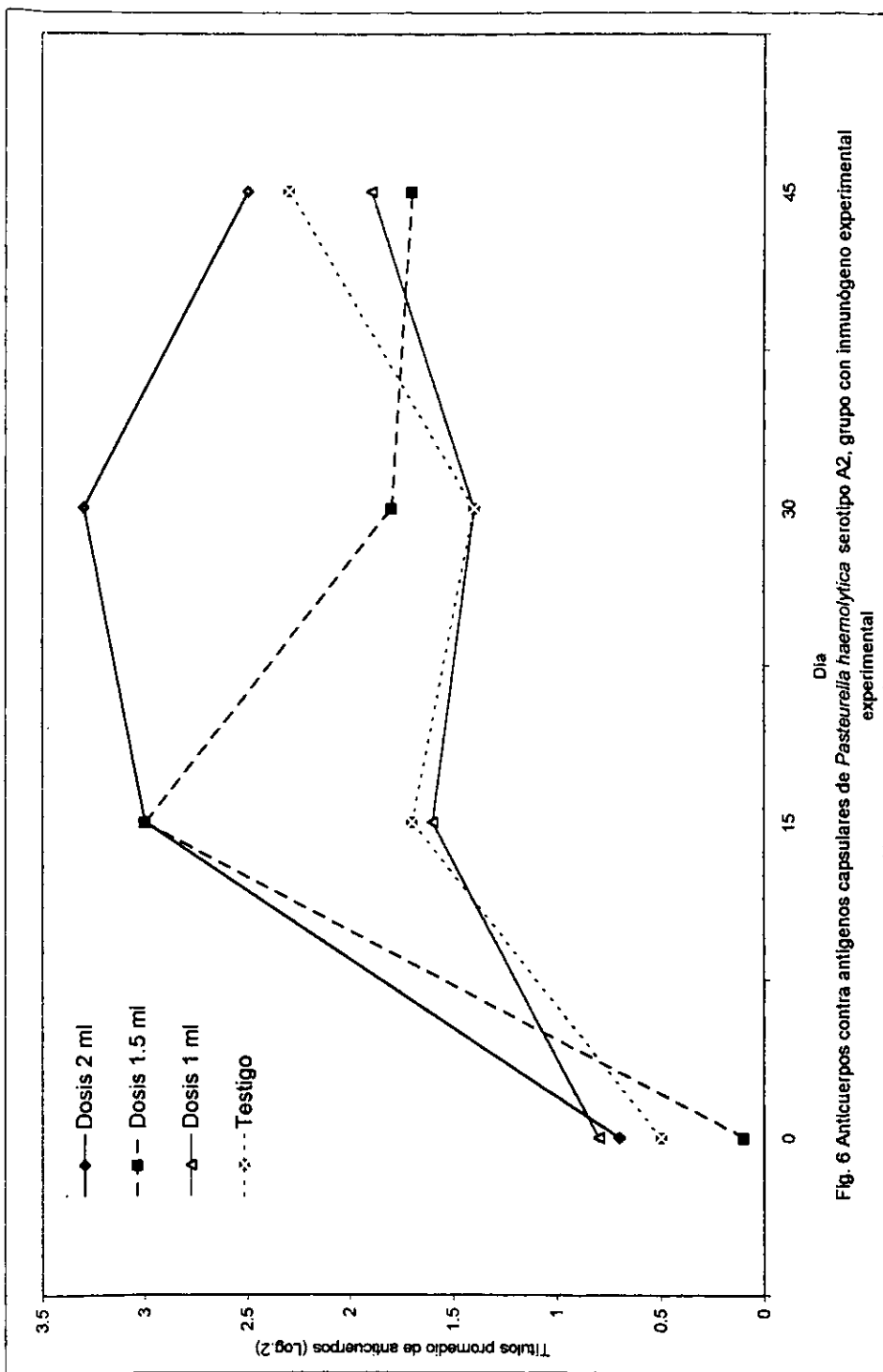


Fig. 6 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A2, grupo con inmunógeno experimental

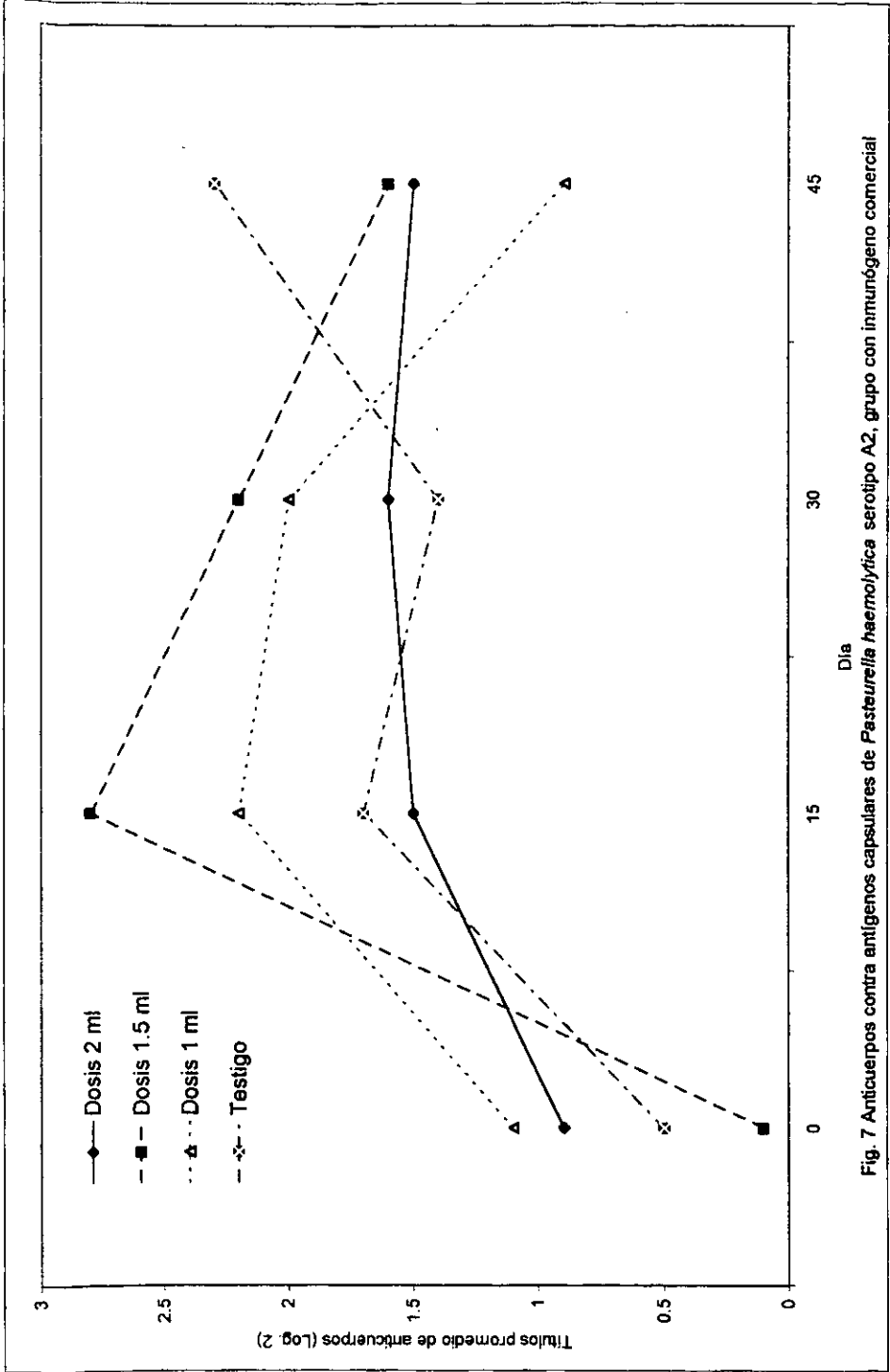


Fig. 7 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A2, grupo con inmunógeno comercial

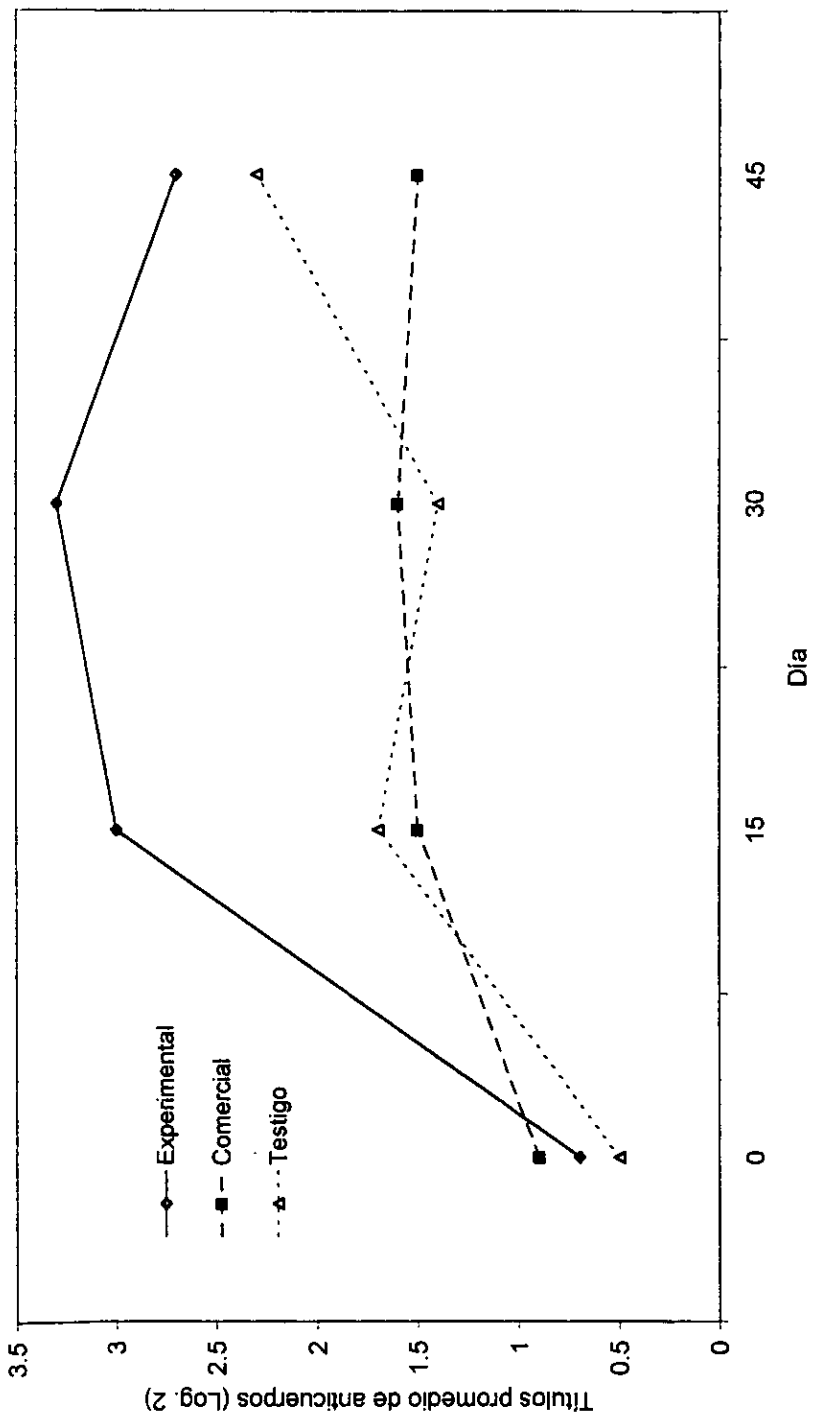


Fig. 8 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A2, comparación de los grupos experimental y comercial con dosis de 2 ml

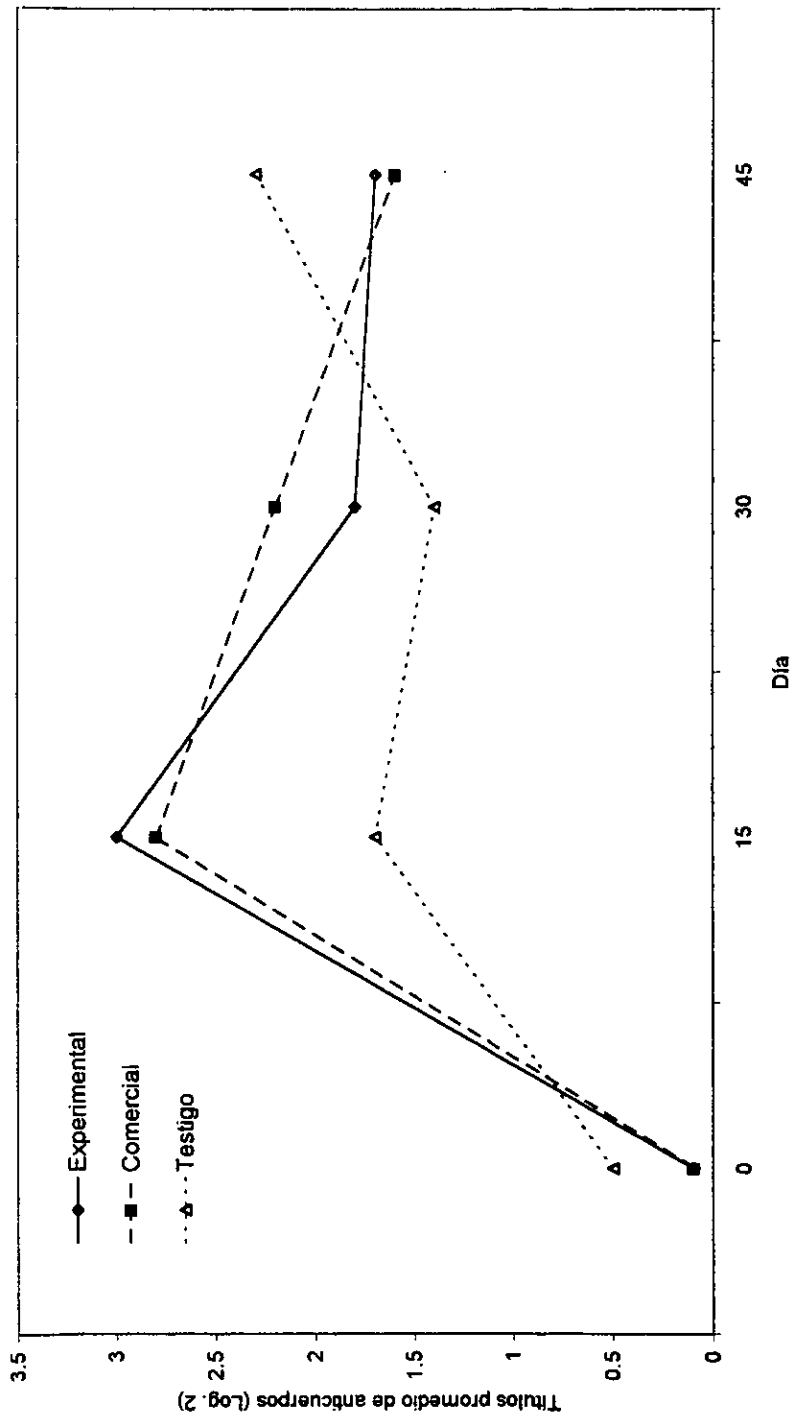


Fig. 9 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A2, comparación de los grupos experimental y comercial con dosis de 1.5 ml

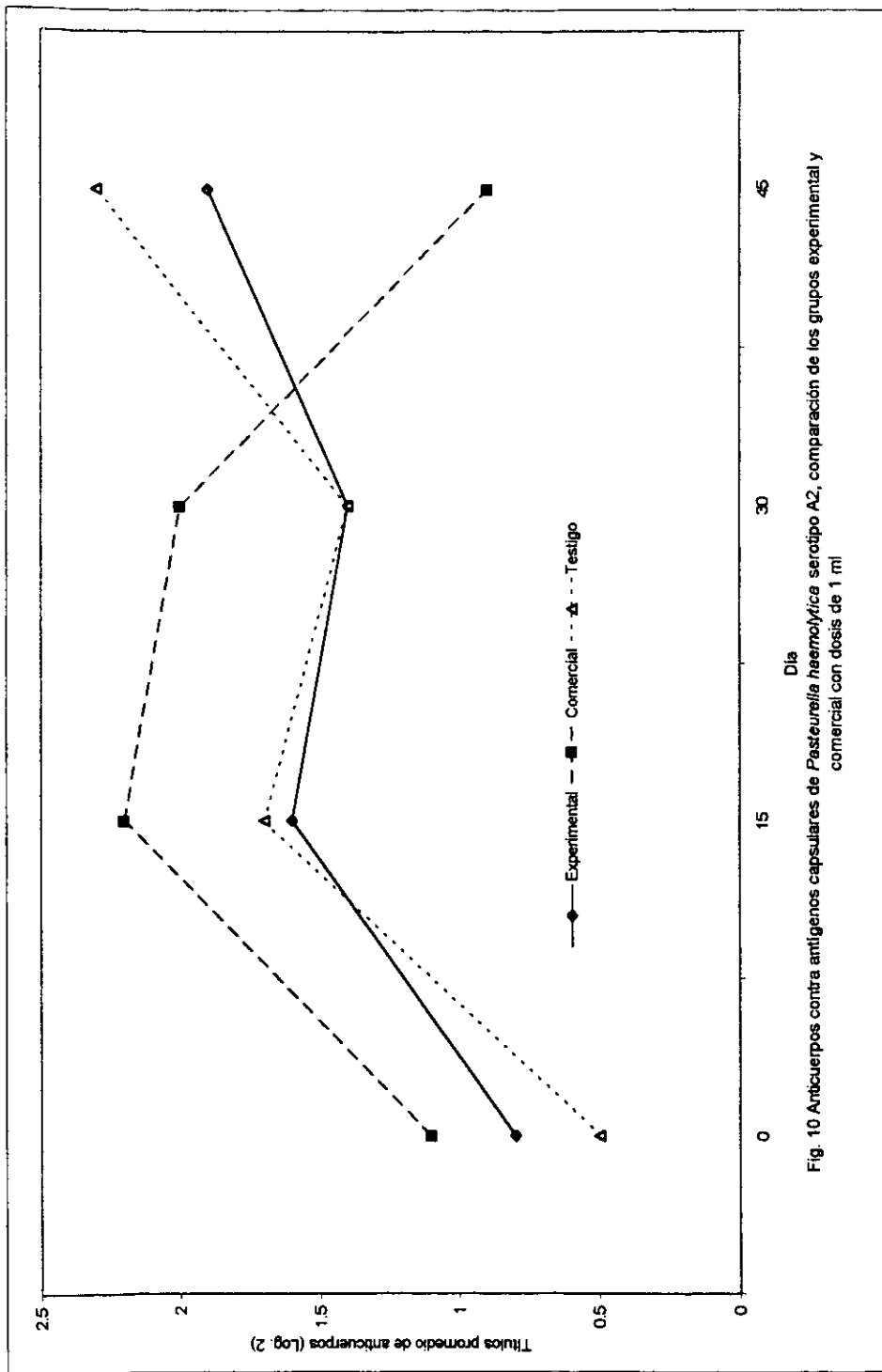


Fig. 10 Anticuerpos contra antígenos capsulares de *Pasteurella haemolytica* serotipo A2, comparación de los grupos experimental y comercial con dosis de 1 ml

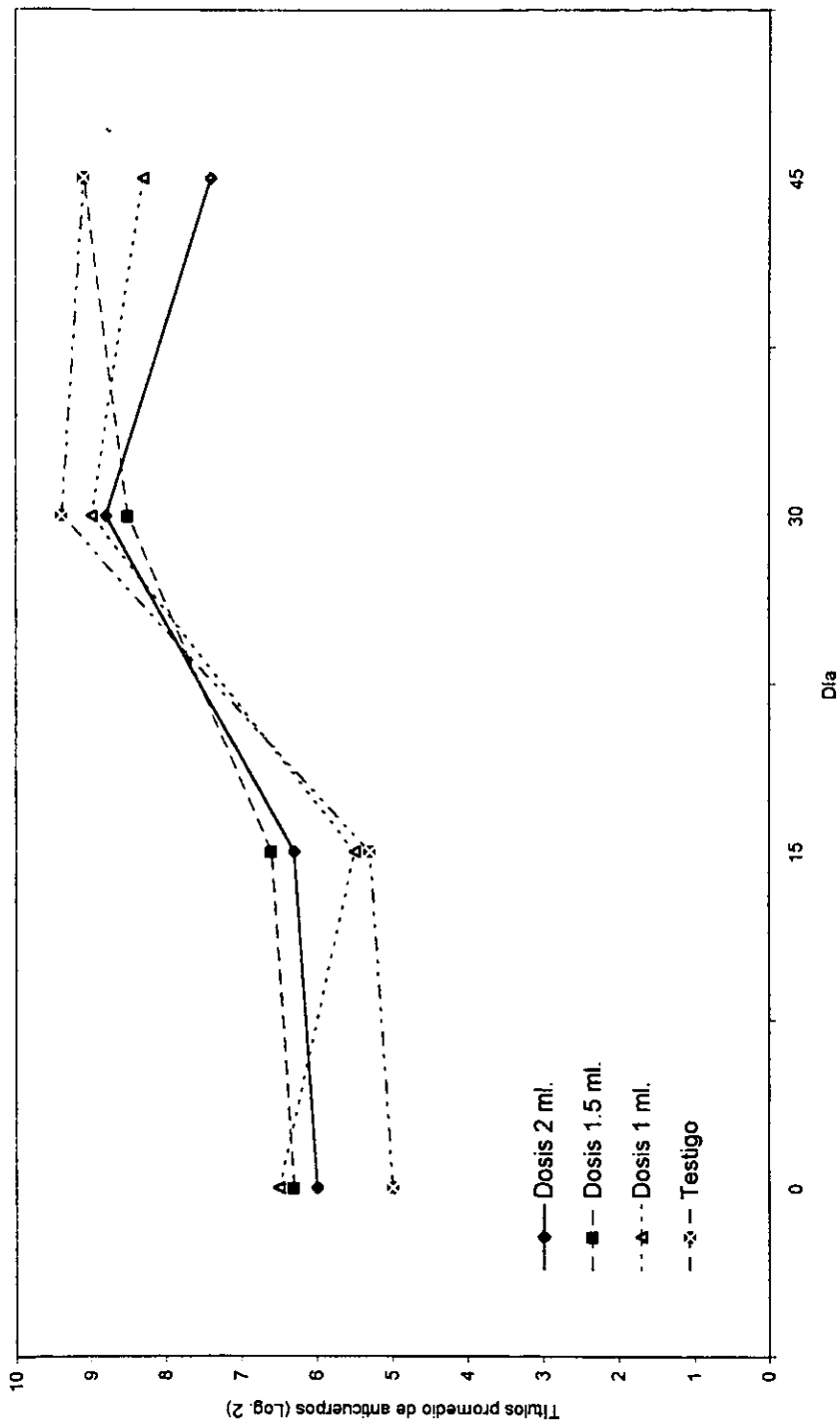


Fig. 11 Anticuerpos contra leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*, grupo con inmúnogeno experimental

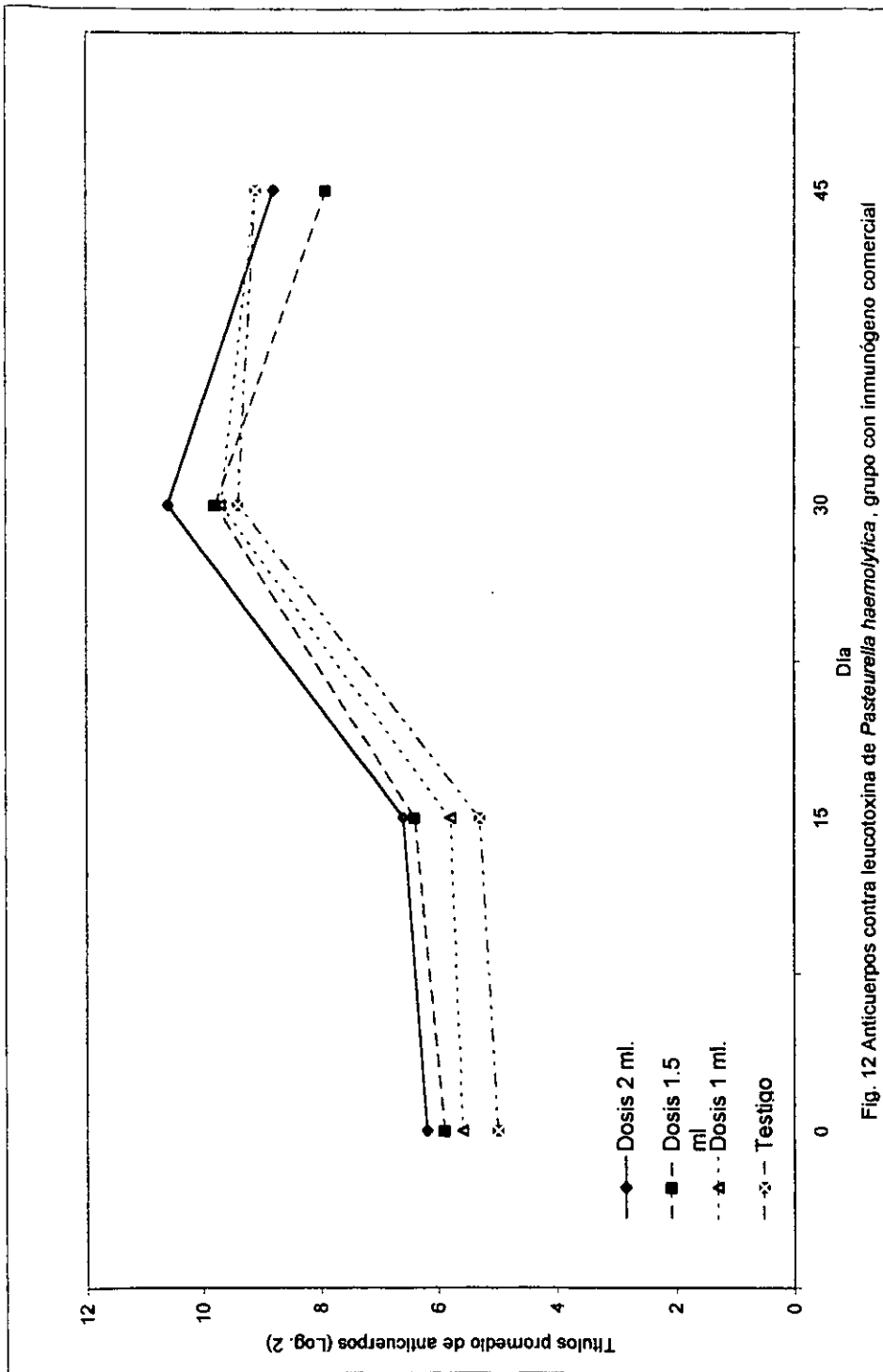


Fig. 12 Anticuerpos contra leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*, grupo con inmunógeno comercial

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 1. Promedio de títulos de anticuerpos contra antígenos capsulares de los serotipos A1, A2 y leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*

GRUPO EXPERIMENTAL					
	1ER MUESTREO	2º MUESTREO	3ER MUESTREO	4º MUESTREO	TOTAL
	PROM.DESVEST	PRO.DESVEST	PROM.DESVEST	PROM.DESVEST	PROM.DESVEST
DOSIS 1ml A1	0.7 + 0.8	3.0 + 1.1	2.0 + 0.8	2.7 + 0.8	2.1 + 1.3
DOSIS 1ml A2	0.8 + 1.0	1.6 + 1.4	1.4 + 1.1	1.9 + 0.7	1.4 + 1.1
DOSIS 1ml LCT	6.5 + 0.7	5.5 + 0.8	9.0 + 0.7	8.3 + 0.7	6.8 + 1.6
DOSIS 1.5ml A1	1.3 + 2.0	2.4 + 1.1	2.3 + 1.4	3.9 + 2.2	2.4 + 2.0
DOSIS 1.5ml A2	0.1 + 0.3	3.0 + 1.2	1.8 + 0.7	1.7 + 0.5	1.7 + 1.3
DOSIS 1.5ml LCT	6.3 + 1.1	6.6 + 0.9	8.5 + 1.7	9.1 + 0.6	7.6 + 1.7
DOSIS 2ml A1	1.5 + 1.4	2.9 + 1.4	3.4 + 0.9	6.4 + 2.4	3.3 + 2.3
DOSIS 2ml A2	0.7 + 1.7	3.0 + 1.1	3.3 + 1.2	2.7 + 0.9	2.4 + 1.6
DOSIS 2ml LCT	6.0 + 1.1	6.3 + 1.0	8.8 + 0.8	7.4 + 0.9	7.1 + 2.0
GRUPO COMERCIAL					
	1ER MUESTREO	2º MUESTREO	3ER MUESTREO	4º MUESTREO	TOTAL
	PROM.DESVEST	PRO.DESVEST	PROM.DESVEST	PROM.DESVEST	PROM.DESVEST
DOSIS 1ml A1	2.0 + 1.4	4.7 + 1.2	2.3 + 1.0	3.1 + 1.3	3.0 + 1.6
DOSIS 1ml A2	1.1 + 1.1	2.2 + 1.1	2.0 + 0.7	0.9 + 0.5	1.6 + 1.0
DOSIS 1ml LCT	5.6 + 0.8	5.8 + 0.7	9.7 + 1.6	9.1 + 1.0	7.5 + 2.1
DOSIS 1.5ml A1	2.0 + 1.8	2.9 + 1.5	2.8 + 1.2	2.3 + 0.9	2.5 + 1.4
DOSIS 1.5ml A2	0.1 + 0.4	2.8 + 0.8	2.2 + 1.3	1.6 + 0.6	1.7 + 1.3
DOSIS 1.5ml LCT	5.9 + 1.0	6.4 + 1.0	9.8 + 1.3	7.9 + 1.2	7.5 + 1.9
DOSIS 2ml A1	0.9 + 1.2	2.2 + 1.4	3.1 + 1.5	2.4 + 1.1	2.1 + 1.5
DOSIS 2ml A2	0.9 + 1.0	1.5 + 1.3	1.6 + 1.1	1.5 + 1.1	1.4 + 1.1
DOSIS 2ml LCT	6.2 + 0.6	6.6 + 0.9	10.6 + 0.8	8.8 + 0.9	8.0 + 2.2
GRUPO CONTROL					
	1ER MUESTREO	2º MUESTREO	3ER MUESTREO	4º MUESTREO	TOTAL
	PROM.DESVEST	PRO.DESVEST	PROM.DESVEST	PROM.DESVEST	PROM.DESVEST
A1	1.3 + 1.5	1.8 + 1.4	2.0 + 1.2	2.5 + 1.7	1.9 + 1.5
A2	0.5 + 1.1	1.7 + 1.1	1.4 + 0.7	2.3 + 1.0	1.5 + 1.2
LCT	5.0 + 2.2	5.3 + 1.7	9.4 + 1.1	9.1 + 0.9	7.2 + 2.6

DISCUSIÓN

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. Estos inmunógenos varían en cuanto a su vía de administración, adyuvantes utilizados, tipos de antígenos: vivos, muertos, extractos y masa antigénica. Al comparar las vías de administración utilizadas en los experimentos se ha demostrado que las de mayor eficacia son: la vía subcutánea, intradérmica y aerolizada (esta última solo de forma experimental) para el caso de bacterias vivas; en tanto que para bacterias muertas la vía subcutánea es la más eficaz. El uso de las bacterinas simples, por su poca eficacia en la prevención de problemas y exacerbación de la enfermedad clínica, se va desechando día con día ^{18, 21}.

Los resultados obtenidos en el desarrollo de vacunas contra la pastereiosis neumónica han sido controversiales en muchos casos y a menudo confusos. Además la terminología que se ha aplicado a la pastereiosis neumónica a lo largo de los años ha complicado la interpretación de muchos estudios ^{21, 54}. La estrategia de análisis de muchos estudios experimentales y de campo también ha sido criticada. Por ejemplo, algunos estudios no contienen información suficiente sobre la evaluación de las vacunas y herramientas metodológicas utilizadas ⁴⁴.

En el presente trabajo se evaluaron dos inmunógenos, uno comercial que según las especificaciones del laboratorio, es una bacterina-toxoide, por lo tanto, contiene bacterias completas muertas del serotipo A1 de *Pasteurella haemolytica* y un compuesto antigénicamente similar a la leucotoxina. Y un inmunógeno experimental que contiene bacterias muertas de los serotipos A2 y A1 de *P. haemolytica* además de un sobrenadante

rico en leucotoxina. La finalidad del estudio fue determinar los títulos de anticuerpos contra antígenos capsulares de los serotipos A1 y A2 y anticuerpos contra leucotoxina de *P. haemolytica* mediante las pruebas de hemaglutinación indirecta y ensayo simple visual respectivamente.

En el caso de la pasterelosis neumónica, los títulos de anticuerpos altos no siempre han sido sinónimo de protección, sin embargo, suelen ser un indicador de la respuesta inmunológica que se está generando en los animales. Es importante señalar que los mecanismos inmunes contra *P. haemolytica* son complejos e incluyen, entre otros: la inmunidad mediada por células, la presencia de IgA en secreciones y la opsonización por anticuerpos específicos conferida por IgG, IgM e IgE. Otro mecanismo importante es el complemento presente a nivel sérico y local. Además se considera importante la presencia de anticuerpos neutralizantes de la leucotoxina en suero y secreciones bronquioalveolares^{24, 42, 54}.

En el presente trabajo se observó que los animales tratados con el inmunógeno comercial tuvieron una respuesta de anticuerpos contra el serotipo A2 de *P. haemolytica*, sin embargo en las especificaciones del laboratorio este serotipo no está incluido.

En un trabajo paralelo realizado con conejos, en el CENID-Microbiología, donde se utilizaron los mismos inmunógenos, se observó que no hubo respuesta de anticuerpos contra los antígenos capsulares del serotipo A1 en el inmunógeno comercial y fue muy evidente la respuesta contra el serotipo A2, aún cuando las especificaciones del producto comercial indican que contiene el serotipo A1 y no es contemplado el serotipo A2. Esto podría tener una ventaja si la vacuna estuviera indicada para borregos dado que el serotipo más común en estos animales es el A2. Sin embargo, esta vacuna fue desarrollada para utilizarse en bovinos y en este caso el serotipo más común es el A1⁵³.

Como pudo observarse, los animales del grupo testigo tuvieron una elevación en los títulos de anticuerpos contra antígenos capsulares y leucotoxina al final del experimento comparable con los animales inmunizados. Este aumento puede ser debido a una infección subclínica, dado que los animales habían sido transportados algunos días antes de iniciar el trabajo y estaban en un proceso de adaptación a un clima y a una estación del año completamente distinta al lugar de su procedencia, a esto se le puede agregar las condiciones de transporte a las que fueron sometidos donde el hacinamiento y la poca ventilación pudieron jugar un papel importante en el desarrollo del proceso neumónico. Con las técnicas utilizadas en el trabajo no es posible determinar si los anticuerpos presentes eran postvacunales o producto de una infección subclínica. Cabe mencionar que algunos animales del grupo control presentaron cuadro clínico de neumonía y uno de ellos murió y el examen postmortem reveló lesiones neumónicas, sin embargo, no fue posible realizar un examen bacteriológico del pulmón. Un detalle que soporta esta hipótesis de la infección por una cepa de campo es que algunas veces los títulos de anticuerpos contra la leucotoxina fueron más altos que en los animales inmunizados. En un trabajo realizado previamente a nivel campo³⁹ se demostró que los títulos de anticuerpos contra la leucotoxina de *P. haemolytica* en animales enfermos clínicamente de neumonía son bajos al momento de detectarse la enfermedad y 15 días después existe una seroconversión y los títulos son más altos en animales enfermos comparado con animales inmunizados.

La masa antigénica total (dosis) puede afectar la respuesta inmune. La eficacia de algunas vacunas es dosis dependiente. La masa antigénica inicialmente baja puede ser apropiada para la vacuna⁴⁴. En este trabajo, los títulos de anticuerpos contra antígenos capsulares de los serotipos A1 y A2 de *P. haemolytica* observados en los animales

tratados con el inmunógeno comercial fueron más altos utilizando una dosis de 1 ml alcanzando títulos de $4.7 + 1.2$ y de $2.2 + 1.1$ en el día 15.

El reciente progreso ha empezado a caracterizar inmunológicamente los componentes importantes de los organismos de *Pasteurella* que pueden volverse básicos en la elaboración de vacunas en el futuro. Los anticuerpos a leucotoxina y ciertos componentes de la superficie bacteriana parecen ser importantes en la resistencia a la enfermedad. La incorporación de estos antígenos mayores en las vacunas futuras ayudaran a entender los factores necesarios para proteger los ovinos contra la pastereiosis neumónica⁵¹.

El efecto protector observado, quizá no se debe a la leucotoxina exclusivamente, ya que en el sobrenadante utilizado, por su proceso de elaboración, están contenidos otros antígenos solubles que podrían jugar un papel importante en la protección conferida a los animales.

Entre estos antígenos se encuentran extractos solubles capsulares, LPS, proteínas de membrana y otros productos del metabolismo de la bacteria. 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 leucotoxina pueden ser importantes en conferir protección contra la pastereiosis neumónica^{14,44}.

La resistencia por parte de los productores para la utilización de vacunas vivas ha llevado a crear nuevas alternativas, como es el inmunógeno que se desarrolló en el presente trabajo, elaborado a partir de bacterias vivas de cultivos de seis horas, que son los que han dado resultados más satisfactorios, argumentándose que este tipo de biológicos son más eficaces debido a que los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico entre el que se encuentra material capsular, leucotoxina y otros carbohidratos no muy bien definidos, gracias al crecimiento que tienen los componentes de la bacteria en la fase logarítmica.

También la replicación del agente en el sitio de la inoculación favorece la estimulación de los mecanismos inmunológicos mediados por células ^{18,21}.

El fracaso de un inmunógeno contra los procesos neumónicos, como se ha mencionado en otros trabajos, se debe a que los serotipos utilizados en la inmunización no corresponden a la zona geográfica o no cumplen con las especificaciones indicadas por el laboratorio; uno de los factores principales en la protección de los procesos neumónicos es la leucotoxina y su presencia en los inmunógenos es importante, y su producción óptima dependerá de las cepas, el medio de cultivo y los productos utilizados para el enriquecimiento de éstos.

El desarrollo de biológicos en México, implica varias ventajas que incluyen: bajo costo de producción, inclusión de cepas nacionales y los serotipos más comunes de acuerdo a las zonas geográficas, el desarrollo de biológicos específicos para las diversas especies animales, entre otros.

CONCLUSIONES

Si bien, los títulos de anticuerpos contra los serotipos A1 y A2 de *Pasteurella haemolytica* para el grupo experimental fueron significativamente más altos que los del grupo comercial, es recomendable realizar un estudio que incluya el desafío y evaluación de lesiones al sacrificio.

La elaboración de nuevos inmunógenos para prevenir el complejo respiratorio en las especies de producción del país, deberán basarse en los serotipos de los microorganismos presentes en cada región geográfica.

Nuevos trabajos sobre el complejo respiratorio deberán ser dirigidos a comprender los mecanismos de defensa celular.

LITERATURA CITADA

1. Aguilar, R.F., Jaramillo, M.L., Morales, A.J.F., Trigo, T.F.J. y Suarez, G.F.: Evaluación de la protección contra la pasteurelisis neumónica, en corderos vacunados con diferentes antígenos de *Pasteurella haemolytica* A1. Vet. Méx. 28: 221-229 (1997).
2. Alley, M.R.: The bacterial Flora of respiratory tract of normal and pneumonic sheep. N. Z. Vet. J., 23: 113-118 (1975).
3. Ambagala, T.C., Ambagala, A.P.N. and Srikumara, S.: The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to 2_2 integrins on bovine leukocytes. FEMS Microbiol. Letters. 179: 161-167 (1999).
4. Ames, T.R, Casagrande, C.L., Werdin, R.E. and Hanson, L.J.: Effect of sulfadimethoxine-orometoprim in the treatment of calves with induced *Pasteurella* pneumonia. Am. J. Vet. Res., 48: 17-20 (1987).
5. Babiuk, L.A.: Broadening the approaches to developing more effective vaccines. Vaccine. 17: 1587-1595 (1999).
6. Barrallo, S., Reglero, A., Revilla-Nuin, B., Martinez-Blanco, H., Rodriguez-Aparicio, L.B. and Ferro, M.A.: Regulations of capsular polysialic acid biosynthesis by temperature in *Pasteurella haemolytica* A2. FEBS Letters. 445: 325-328 (1999).
7. Basaraba, R.J., Byerly, A. N., Mosier, D.A., Butine, M.D., Stewart, G.C., Fenwick, B.W., Chengappa, M.M. and Highlander, S.K.: Actin polymerization enhances *Pasteurella haemolytica* leukotoxicity. Vet. Microbiol. 64:307-321 (1999).
8. Biberstein, E. L. and Chung, Z.Y.: Tratado de microbiología veterinaria. Acribia. 11-14 (1990).

9. Black, H. and Duganzich, D.: A field evaluation of the efficacy of two vaccines against ovine pneumonic pasteurellosis. *New Zealand Veterinary Journal*. 43: 60-63 (1995).
10. Blanco, V.F.J., Trigo, T.F.J., Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Tapia, P.G. y Suarez, G.F.: Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet. Méx.* 24: 107-112 (1993).
11. Blood and Henderson.: *Pasteurellosis de porcinos, ovinos y caprinos*. Medicina Veterinaria 6ª. Edición. Editorial Interamericana. 658-660 (1986).
12. Burrows, G.E.: Effects of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia on the pharmacokinetics of erythromycin in the calf. *Am. J. Vet. Res.* 46: 798-803 (1985).
13. Cardella, M.A., Adviento, M.A. and Nervig, R.M.: Vaccination studies against experimental bovine *Pasteurella* pneumonia. *Can. J. Vet. Res.* 51: 204-211 (1987).
14. Carlton, L. G. and Thoen, Ch. O.: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Iowa State University press/ames. 2ª edition. 156-165 (1993).
15. Confer, A.W. and Durham, J.A.: Sequential development of antigens and toxins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1 grown in cell culture medium. *Am. J. Vet. Res.* 53: 646-652 (1992).
16. Confer, A.W., Clinkeanbeard, K.D., Gatewood, D.M., Driskel, B.A. and Montelongo, M.: Serum antibody responses of cattle vaccinate with partially purified native *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vaccine*. 15: 1423-1429 (1997).
17. Confer, A.W., Fulton, R.W., Clinkenbeard, K.D. and Driskel, B.A.: Duration of serum antibody responses following vaccination and revaccination of cattle with non-living commercial *Pasteurella haemolytica* vaccines. *Vaccine*. 16: 1962-1970 (1998).

18. Confer, A.W., Panciera, A.J., Corstvet, R.E., Rummage, J.A. and Fulton, R.W.: Bovine pneumonic pasteurellosis: effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. Am. J. Vet. Res. 45: 2543-2545 (1984).
19. Confer, A.W., Panciera, R.J. and Mosier, D.A.: Bovine pneumonic pasteurellosis: immunity to *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 193: 1308-1316 (1988).
20. Confer, A.W., Panciera, R.J. and Mosier, D.A.: Serum antibodies to *Pasteurella haemolytica* lipopolisaccharide: relationship to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Am. J. Vet. Res. 47: 1134-1138 (1986).
21. Confer, A.W., Panciera, R.J., Corsvet, R.E., Rummage, J.A., and Fulton, R.W.: Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. Am. J. Vet. Res. 45: 2543 (1984).
22. Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. and Fulton, R.W.: Immunologic response to *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental bovine pneumonic pasteurellosis, induced by bacterins in oil adjuvants. Am. J. Vet. Res. 48: 163-168 (1987).
23. Conlon, P., Gervais, M., Chaudari, S. and Conlon, J.: Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxic culture supernatant on bovine neutrophil aggregation. Can. J. Vet. Res. 56: 199-203 (1992).
24. Cho, H.J., Bohac, J.C., Yates, W.D.G. and Ohmann, H.D.: Anticytotoxin activity of bovine sera and body fluids against *Pasteurella haemolytica* A1 cytotoxin. Can. J. Comp. Med. 48:151 (1984).
25. Davies, D.H., Dungworth, D.L., Humphreys, S. and Johnson, A.J.: Concurrent infection of lambs parainfluenza virus type 3 and *Pasteurella haemolytica*. N. Z. Vet. J. 263-265 (1977).

26. Ellis, R.W.: Development of combination vaccines. *Vaccine*. 17: 1635-1642 (1999).
27. Espino, R.G., Morales, A.J.F., Sanchez-Mejorada, P.H., Zepeda, M.O.O. y Trigo, T.F.J.: Determinación de anticuerpos contra antígenos capsulares y citotóxicos de *Pasteurella haemolytica* en suero de ovinos. 1er Congreso Nacional de Producción Ovina. (AMTEO). 185-188 (1988).
28. Gatewood, D.M., Fenwick, B.W. and Chengappa, M.M.: Growth-condition dependent expression of *Pasteurella haemolytica* A1 outer membrane proteins, capsule, and leukotoxin. *Vet. Microbiol.* 41: 221-223 (1994).
29. Gilmour, N.J.L., Sharp, J.M. and Gilmour, J.S.: Effect of oxytetracycline therapy on experimentally induced pneumonic pasteurellosis in lambs. *The Veterinary Record*. July 31: 97-99 (1982).
30. González, R.C.: Aislamiento y caracterización parcial de *Pasteurella* sp. De cuadros neumónicos en bovinos y ovinos. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México (1997).
31. Gourlay, R.N., Thomas, L.H., Wyld, S.G. and Smith, C.J.: Effect of a new macrolide antibiotic (tilmicosin) on pneumonia experimentally induced in calves by *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica*. *Res. Vet. Sci.* 47: 84-89 (1989).
32. Gummow, B. and Mapham, P.H.: A stochastic partial-budget analysis of and experimental *Pasteurella haemolytica* feedlot vaccine trial. *Prevent. Vet. Med.* 43: 29-42 (2000).
33. Highlander, S.K.: Growth of *Pasteurella haemolytica* and production of its leukotoxin in semi-defined media. *Am. J. Vet. Res.* 58: 749-754 (1997).

34. Jericho, K.W.F., Cho, H.J. and Kozub, G.C.: Protective effect of inactivated *Pasteurella haemolytica* bacterin challenged in bovine herpesvirus-1 experimentally infected calves. *Vaccine*. 8:315 (1990).
35. Jones, G.E., Donachie, W., Sutherland, A.D., Knox, D.P. and Gilmour, J.S.: Protection of lambs against experimental pneumonic pasteurellosis by transfer of immuniserum. *Vet. Microbiol.* 20:59-71 (1989).
36. Kaehler, K.L., Markham, R.J.F., Muscoplat, C.C. and Johnson, D.W.: Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. *Infection and Immunity*. 30: 615-616 (1980).
37. Kamil, S.A., Parihar, N.S., Kali Charan, Kumar, P.N. and Naik, D.: Experimental *Pasteurella haemolytica* infection in sheep. *In. J. of An. Sci.* 64: 1123-1125 (1994).
38. Makie, J.T., Barton, M., Hindmarsh, M. and Holsworth, I.: *Pasteurella haemolytica* septicaemia in sheep. *Australian Vet. J.* 72: 474 (1995).
39. Martin, S.W.: Vaccination: Is it effective in preventing respiratory disease or influencing weight gains in feedlot calves? *Canadian Veterinary Journal*. 24: 10-19 (1983).
40. Martínez, A., Cuéllar, O.J.A., Hernández, J., Piojan, A.P. y Tórtora, P.J.L.: Estudios sobre las situaciones que determinan la mortalidad de corderos, en ranchos del Estado de México. *Ier Congreso Nacional de Producción Ovina. (AMTEO)*. 176-179 (1988).
41. Morales, A.J.F.: Avances y perspectivas sobre inmunización contra la pasterelosis neumónica en ovinos. *Resúmenes del simposio de inmunología del aparato respiratorio. FESC-UNAM* 19-26 (1994).

42. Morales, A.J.F., Jaramillo, M.L., Oropeza, V.Z., Tortora, P.J.L., Trigo, T.F.J. y Espino, R.G.: Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Vet. Méx.* 24: 97-105 (1993).
43. Moreno, C.B., Tórtora, P.J.L. y Trejo, G.A.A.: Causas de morbilidad y mortalidad en corderos. Bases de la cría ovina III (AMTEO) Querétaro, Qro. 75-76 (1996).
44. Mosier, D.A., Panciera, R.J., Rogers, D.P., Uhlich, G.A., Butine, M.D., Confer, A.W. and Basaraba, R.J.: Comparison of serologic and protective responses induced by two *Pasteurella* vaccines. *Can. J. Vet. Res.* 62: 178-182 (1998).
45. Panciera, R.J., Corstvet, R.E., Confer, W.A. and Gresham, C.N.: Bovine pneumonic pasteurellosis: effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am. J. Vet. Res.* 45: 2538-2542 (1984).
46. Peeler, E.J. and Wuanyangu, S.W.: Infectious causes of small ruminants mortality in Kenya: A review. *Small. Rumin. Res.* 29:1-11 (1998).
47. Purdy, C.W., Raleigh, R.H., Collins, J.K., Watt, J.L. and Straus, D.C.: Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lung of stressed feeder calves. *Current microbiology.* 34: 244-249 (1997).
48. Ramírez, R.R. y Brogden, K.A.: Patogénesis del daño pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 37: 353-365 (1995).
49. Sabri, M.Y., Zamri-Saad, M., Motalib, A.R., Israf, D.A. and Moniandy, N.: Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet. Microbiol.* 73: 13-23 (2000).
50. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Vet. Res.* 52: 30-36 (1988).

51. Trigo, T.F.J.: Complejo respiratorio en ovinos y caprinos. Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. Ed. Piojan P. y Tórtora J. 9-17 (1986).
52. Trigo, T.F.J. Patología Sistemica Veterinaria. 2ª. Ed. Editorial Interamericana. 148-150.
53. Vázquez, L. R.: Tesis de Carrera Técnica de Laboratorio Clínico. CBTyS. (2000).
54. Wilkie, B.N. and Markham, R.J.F.: Sequential titration of bovine lung and serum antibodies after parenteral or pulmonary inoculation with *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 40: 1690 (1979)