

11622
2
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

**“PERFIL SEROLÓGICO CONTRA ANTÍGENOS DE
Mannheimia (Pasteurella) haemolytica EN CORDEROS
CLÍNICAMENTE ENFERMOS DE NEUMONÍA Y
DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
CYNTHIA GONZÁLEZ RUÍZ

COMITÉ TUTORIAL
DIRECTOR DE TESIS:
FRANCISCO J. TRIGO TAVERA

ASESORES:
JORGE L. TÓRTORA PÉREZ
J. FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ

México D.F. Julio del 2003

7



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi Madre:

Ser una Mujer fuerte y perseverante es el ejemplo que me has dado, quiero darte las gracias por haberme dado la vida, por enseñarme ha ser hija, esposa, amiga y ahora madre de mi hija, gracias por hacerme fuerte en los momentos difíciles, por apoyarme y ser el verdadero roble de esta familia; sin ti, no hubiera logrado lo que ahora soy. Mámi valieron la pena tantos sacrificios, este trabajo esta dedicado principalmente a ti y a todos el tiempo dedicado a tu familia, a tus esfuerzos de madre no solo mía, sino también de mis hermanos, primos y ahora de tus nietos. ¡Mil Gracias!

¡Que Dios te bendiga Mamá, te amo!

A mis hijos:

Dios me dio la oportunidad de ser madre y hoy me siento satisfecha de poder ofrecerles este logro que más mío es de ustedes, espero en un futuro compartir y disfrutar de la misma manera de los suyos. Hijos, trascender en la vida es amar lo que uno hace, con dedicación y empeño se pueden alcanzar aquellos objetivos trazados en la vida, aunque esto implique llevar a cabo muchos sacrificios.

¡Los amo!

A mi hija:

Chiquita mía, quiero que sepas que eres la luz que ilumina mi vida y me impulsa a seguir adelante. No dejes que la adversidad te derrote, debes luchar y seguir adelante para llegar hasta donde quieras y veras entonces, que tus más grandes ilusiones se pueden hacer realidad. Abi, hoy y siempre te dedico mis esfuerzos; compartamos juntas la maravilla de alcanzar nuestros sueños.

¡Te amo pollito!

B

Alfredo:

El camino ha sido difícil, pero no imposible, gracias por hacerme más fuerte ante la vida, gracias por darme la dicha de ser madre de una niña tan hermosa como lo es nuestra hija. Este es el inicio de un camino aún más difícil y deseo poder seguir compartiéndolo contigo. Las oportunidades de realizarnos en la vida ahí están, tomémoslas y no las dejemos escapar, solo se vive una vez, disfrutémosla al máximo entonces.

iTe amo!

A mi Padre:

Gracias por esa fuerza interna que solo tu tienes, que me nutre e impulsa para seguir en el camino. Gracias por confiar en mí, por ser mi eterno guía, mi padre, amigo y el apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida. Me siento muy orgullosa de ser tu hija, me has enseñado a enfrentar la vida con entereza, a disfrutar y aprender de mis triunfos y derrotas. ¡Este trabajo es el resultado de lo que tú y mi mamá me enseñaron y con esto quisiera retribuirte un poco de lo mucho que me has dado!

iTe amo Papá!

A mis hermanos, cuñados y a mi sobrino:

Son ustedes la energía que retroalimenta mi alma y espíritu para continuar en la vida. Cada uno de ustedes ha sido ejemplo a seguir y espero no defraudarlos. Gracias por todo su apoyo, cariño y confianza. ¡Mis triunfos siempre serán los suyos!

iLos amo!

A mis amigos:

Por su entrañable amistad a Sandra, Rubén, Juan Carlos, Pedro, Aurora, Hugodeorleans, Blanca, Juan, Ernesto, Gustavo, Alejo, Omar, Emita, Norhan, Ana, Ingrid y a todas las personas que de alguna manera me brindaron su incondicional apoyo y amistad.

iMil Gracias!



AGRADECIMIENTOS:

A mis asesores:

Dr. Francisco J. Trigo Tavera, Dr. Jorge L. Tórtora Pérez y al MC J. Francisco Morales Álvarez, por su paciencia dedicación y empeño para que este trabajo se concluyera satisfactoriamente.

Al Jurado:

PRESIDENTE:	Dr. Abel Ciprian Carrasco
VOCAL:	Dr. Víctor R. Tenorio Ramírez
SECRETARIO:	Dr. Dr. Jorge L. Tórtora Pérez
PRIMER SUPLENTE:	MC J. Francisco Morales Álvarez
SEGUNDO SUPLENTE:	Dr. Francisco J. Trigo Tavera

Al Dpto. de Bacteriología del CENID Microbiología (INIFAP-SAGARPA).

Agradezco con mucho cariño a todas y cada una de las personas que conforman este departamento, porque además de haberme facilitado instalaciones, material y equipo para la realización de este trabajo de tesis, me brindaron una vez más su incondicional amistad.

Al MC Dionisio Córdova López del Dpto. de Epidemiología del CENID Microbiología (INIFAP-SAGARPA). Por su amable y desinteresada ayuda para completar este trabajo de Tesis.

Al MC Jorge A. Cuéllar Ordaz, Ing. Gustavo Mercado Mancera y al Dr. Jesús J. Guerra Santos, por el tiempo otorgado desinteresadamente a la elaboración de este trabajo.



RESUMEN

El efecto de las neumonías en animales domésticos es de suma importancia, ya que afecta directamente el proceso productivo de las explotaciones comerciales. Estudios realizados en México, destacan la importancia de las neumonías en becerros, ya que la incidencia y prevalencia alcanzan hasta un 24 % en la etapa de lactancia. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* es el agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes. La cual produce una pleurobronconeumonía fibrinosa severa. *M. haemolytica* expresa diferentes antígenos en distintas condiciones de crecimiento, de manera que la presencia de éstos podría estar alterada tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Cada uno de éstos antígenos podría contribuir a la patogenia de la enfermedad e inducir una respuesta inmune específica por parte del individuo. El objetivo del presente trabajo fue determinar la respuesta de anticuerpos contra algunos antígenos de *M. haemolytica*, tales como LKT (leucotoxina) y PME (proteínas de membrana externa), mediante la técnica de inmunoelctrotransferencia y ensayo visual simple, en corderos clínicamente enfermos de neumonía, en recuperados, clínicamente sanos y animales desafiados experimentalmente. Se recuperó un total de 155 sueros de diferentes zonas geográficas del país, así como 56 sueros de los animales desafiados. Para la determinación de anticuerpos-antiLKT, se llevó a cabo un ensayo simple visual, de donde se obtuvieron los títulos promedio de los diferentes grupos evaluados. Los títulos de anticuerpos-antiLKT mostraron un respuesta inmune humoral específica tanto en condiciones de campo como experimentales, desarrollándose títulos altos en aquellas situaciones más activas de la enfermedad. Se obtuvieron las fracciones celulares de *M. haemolytica* por sonicado y ultracentrifugación. Posteriormente se realizó SDS-PAGE para la separación de las PME, posteriormente se hicieron inmunoelctrotransferencias de las fracciones de membrana externa, enfrentándolas con los sueros de los animales muestreados en campo y desafiados experimentalmente. De las PME se seleccionaron ocho proteínas que se reconocieron con mayor frecuencia por el suero de los animales muestreados en campo y desafiados en el laboratorio. Dicha evaluación muestra relación significativa en el reconocimiento de las proteínas 1 (94kDa), 7 (35kDa) y 8(27kDa) en las diferentes regiones muestreadas. Lo cual indica que al menos una de la 8 regiones podría estar influyendo de manera directa en el reconocimiento de dichas proteínas. Los diferentes grupos y muestreos, también revelaron importante significancia en el reconocimiento de las proteínas: 1(94kDa), 2(88kDa), 5(53kDa), 6 (45 kDa), 7(35kDa) y 8(27kDa). La fiebre que desarrollaron algunos individuos está significativamente relacionada con las proteína antes mencionadas además de la 4 (63kDa) y 6(45kDa). Los animales en condiciones experimentales reconocieron a otras proteínas adicionales de variables pesos moleculares diferentes a las ocho seleccionadas. Por lo tanto concluimos de manera general, que la respuesta inmune a los diferentes antígenos que expresa *M. haemolytica* tanto en condiciones de campo, como experimentales, demuestra ser específica a los antígenos evaluados en éste proyecto.

Palabras.claves: *Mannheimia haemolytica*, neumonía, corderos.

ABSTRACT

The effect of pneumonias is quite relevant on domestic animals, mostly because interferes with animal productivity in commercial farms. Studies conducted in Mexico revealed the relevance of pneumonias in calves with a prevalence up to 24%. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* is a common agent associated to pneumonias in ruminants, producing a severe fibrinous pleuropneumonia. *M. haemolytica* show different antigens under different growth conditions, therefore the presence of these antigens can be altered under *in vitro* or *in vivo* models. Each one of these antigens could also contribute to the development of the disease and induce a specific immune response by the host. The objective of this study was to determine the antibody response against some *M. haemolytica* antigens through immunoelectrotransference and the simple visual assay, against the leucotoxin and outer membrane proteins in lambs either clinically sick with pneumonia, pneumonia recovered lambs, clinically healthy lambs and lambs experimentally challenged with *M. haemolytica*. A total of 155 ovine sera from different geographical regions of Mexico and 56 sera from challenged animals were recovered for the study. Cellular fractions of *M. haemolytica* were obtained through sonication and ultracentrifugation and SDS-PAGE was done for the separation of the OMP. Later an immunoelectrotransference of the outer membrane fractions was done against the sera from lambs sampled in the field or experimentally challenged. For the determination of antileucotoxin antibodies, a simple visual assay was done, obtaining the average titers of the different lamb groups. From the OMP 8 proteins were selected which were more frequently recognized by the lambs' sera. These were 1 (94 kDa), 2 (88 kDa), 5 (53 kDa), 7 (35 kDa) and 8 (27 kDa). It was also observed that in different geographical regions there is a consistent recognition of proteins 1 (94 kDa), 7 (35 kDa) and 8 (27 kDa). The different groups and samplings, also revealed an important significance in the recognition of proteins: 1 (94 kDa), 2 (88 kDa), 5 (53 kDa), 6 (45 kDa), 7 (35 kDa) and 8 (27 kDa). The fever that significantly is developed in some individuals is related to the protein before mentioned in addition to the 4 (63 kDa) and 6 (45 kDa). Lambs in experimental conditions recognized a new variety of proteins with different molecular weights, different to the 8 previously selected proteins. We conclude that the immune response to different antigens which shows *M. haemolytica* either in field or in experimental conditions, is specific to the antigens evaluated in this study.

Key words: *Mannheimia haemolytica*, pneumonia, lambs.



ÍNDICE DE MATERIAS	PAGINAS
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Antecedentes.....	1
I.2. <i>Mannheimia (Pasteurella) haemolytica</i>	2
I.3. Patogenia de la Pasteurelosis Neumónica.....	3
II. FACTORES DE PATOGENICIDAD.....	7
II.1. Leucotoxina.	7
II.2. Lipopolisacárido.	11
II.3. Proteínas de Membrana Externa	14
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPÓTESIS.	18
V. OBJETIVOS GENERALES.	18
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.	19
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.	20
VII. I. FASE DE CAMPO.	
VII.1. Material biológico.	20
VII.1.2. Muestreo serológico de animales en campo.....	20

VII.3. PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA (LKT) DE <i>M. haemolytica</i> PARA LA PRUEBA VISUAL SIMPLE.....	22
VII.3.1. Material Bacteriológico.....	22
VII.3.2. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	23
VII.3.3. Producción de LKT.....	23
VII.3.4. Titulación de LKT de <i>M. haemolytica</i>	24
VII.3.4.1. Obtención de leucocitos de sangre periférica.....	24
VII.3.4.2. Titulación de LKT.....	24
VII.3.5. Determinación de anticuerpos contra la LKT de <i>M. haemolytica</i>.....	25
VII.4. TÉCNICA DE OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>M. haemolytica</i>.....	25
VII.4.1. Purificación de proteínas en solución en presencia de detergentes y lípidos.....	26
VII.4.2. Cuantificación de proteínas.....	26
VII.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (PAGE-SDS).....	27
VII.5.1. Preparación de la muestra.	27
VII.5.2. Corrimiento electroforético.	27

4

VII.6. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOTT).....	28
VII. II. FASE DE DESAFIO EXPERIMENTAL.	
VII.7. MUESTREO SEROLÓGICO DE ANIMALES DESAFIADOS.....	29
VII.8. DESAFÍO VIRAL.....	29
VII.9. DESAFÍO BACTERIANO.	30
VII.10. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	30
VIII. RESULTADOS.....	32
IX. DISCUSIÓN.....	58
X. CONCLUSIONES.....	70
XI. ANEXO 1.....	72
XII. LITERATURA CITADA.....	76

H

INDICE DE CUADROS.**PAGINA**

CUADRO 1.1 Distribución del total de muestras serológicas obtenidas en campo en las diferentes regiones.....	21
CUADRO 1.2 Frecuencia y porcentaje de muestras obtenidas en campo de los diferentes grupos de animales.....	22
CUADRO 1.3 Pruebas Bioquímicas de identificación de <i>M. haemolytica</i>	23
CUADRO 2.1 Calendarización del desafío viral y bacteriano, así como del muestreo de sangre de los animales desafiados experimentalmente.....	31
CUADRO 2.2 Análisis de Máxima verisimilitud de la respuesta a las 8 proteínas, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....	49
CUADRO 3.1 Frecuencia y porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas por los sueros obtenidos en las diferentes regiones de los animales desafiados experimentalmente.....	50
CUADRO 3.2 Frecuencia y Porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas por grupo de animales muestreados en campo.....	51
CUADRO 3.3 Frecuencia y porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas del grupo de animales muestreados en condiciones experimentales y que presentan fiebre.	54
CUADRO 3.4 Frecuencia y porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas del suero de animales muestreados en campo en la región 1 (JILOTEPEC, EDO. DE MÉX.) y que presentaron cambios de temperatura corporal.....	55

CUADRO 3.5 Frecuencia y porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas del total de sueros obtenidos a partir de animales muestreados en condiciones experimentales y distribuidos según los cambios de temperatura corporal56

h

INDICE DE FIGURAS**PAGINA**

Fig.1 Título promedio de anticuerpos antileucotoxina de animales muestreados en campo.....	33
Fig.2 Título promedio de anticuerpos antileucotoxina de animales desafiados experimentalmente.....	35
Fig.3 Electroforesis de las tres fracciones celulares de <i>M. haemolytica</i>.....	36
Fig.4 Electroforesis de la fracción de proteínas de membrana externa de <i>M. haemolytica</i>.....	37 y 45
Fig.5 Electroforesis de la fracción de proteínas de membrana externa de <i>M. haemolytica</i>.....	38 y 46
Fig.6 Inmunoelctrotransferencia del suero de animales muestreados en Chimilpa y Apan Hgo.....	40
Fig.7 Inmunoelctrotransferencia del suero de animales muestreados en Jilotepec, Edo. de Méx.....	41
Fig.8 Inmunoelctrotransferencia del 1^{er} muestreo de los animales desafiados experimentalmente.....	43
Fig.9 Inmunoelctrotransferencia del 4^o muestreo de los animales desafiados experimentalmente.....	45
Fig. 10 Porcentaje de reconocimiento a las 8 proteínas en estudio de los animales muestreados en campo.....	52
Fig. 11 Temperatura de animales muestreados durante el desafío experimental.....	57

ANÁLISIS DE ESTIMACIÓN DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

CUADRO A1.1 Análisis de la respuesta a la proteína 1 (94 kDa), contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....72

CUADRO A1.2 Análisis de la respuesta a la proteína 2 (88 kDa), contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....72

CUADRO A1.3 Análisis de la respuesta a la proteína 3 (68 kDa), contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....73

CUADRO A1.4 Análisis de la respuesta a la proteína 4 (63 kDa), contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....73

CUADRO A1.5 Análisis de la respuesta a la proteína 5 (53 kDa), contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....74

CUADRO A1.6 Análisis de la respuesta a la proteína 6 (45 kDa), contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....74

CUADRO A1.7 Análisis de la respuesta a la proteína 7 (35 kDa), contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....75

CUADRO A1.8 Análisis de la respuesta a la proteína 8 (27 kDa), contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.....75

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes.

El impacto de las neumonías en animales domésticos es de suma importancia, ya que afecta directamente al proceso productivo de las explotaciones comerciales incidiendo de manera importante en la economía del productor, así como del país. Estudios realizados en México, destacan la importancia de las neumonías en becerros, ya que clínicamente la incidencia y prevalencia alcanzan hasta un 24% en la etapa de lactancia.¹ Otros estudios sobre mortalidad de corderos han determinado que la muerte asociada a neumonías puede rebasar el 20%. En estos trabajos se ha demostrado que el mayor porcentaje de mortalidad por problemas neumónicos se acentúa entre los dos y tres meses de edad.^{2,3}

Los datos sobre prevalencia de neumonías varían según el país de procedencia, tipos de explotación, edad de los animales y época del año en que se realiza el estudio. Las tasas promedio de incidencia en corderos varían del 10 a 40%, tanto en México como en el extranjero. Sin embargo, los valores obtenidos en estudios de Centros de Diagnóstico son más bajos que los de rastro.⁴

La pasteurelosis neumónica bovina fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1915 y en el Reino Unido en 1925.⁵ La morbilidad que ocasiona la pasteurelosis neumónica bovina en el ganado es un problema desafiante y persistente. En Estados Unidos, las pérdidas asociadas a la industria de la producción de carne, son de aproximadamente 800 millones de dólares anuales. Los veterinarios no han podido controlar ni prevenir totalmente esta enfermedad, debido a que no se ha logrado entender completamente su patogenia.⁶

Esta enfermedad, es multifactorial e involucra una combinación de estrés, factores ambientales y agentes infecciosos. La etiología, epidemiología y lesiones, han sido bien estudiadas y es generalmente aceptado que *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* es el principal agente de la pleuroneumonía fibrinosa severa.^{7,8}

Algunas investigaciones se han avocado a entender detalladamente la patogenia de la interacción, entre la respuesta del hospedador y *M. haemolytica* en el aparato respiratorio de los rumiantes.⁹

1.2 *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*.

Ésta es una bacteria gram negativa de forma cocobacilar (1 a 3 μ m de diámetro), inmóvil, encapsulada, oxidasa positiva, indol negativa, aerobia y anaerobia facultativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas, es negativa a las pruebas de rojo de metilo, gelatinasa, Voges Proskauer. Crece en agar Mc Conkey, en medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre produciendo β -hemólisis y formando colonias de color blanco grisáceo. La presencia de cápsula, con propiedades de superficie antifagocíticas, la hacen parcialmente resistente a la fagocitosis.¹⁰

La *M. haemolytica* es el agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes.¹¹ La primera información del problema apareció en 1921, donde se aisló el germen de rumiantes, y en 1932 se propuso el nombre de *Pasteurella haemolytica*.^{12,13} El conjunto de cepas negativas a la trealosa de *Pasteurella haemolytica*, han sido recientemente reclasificadas a un nuevo género denominado *Mannheimia*. Este género consta de cinco especies establecidas en cambios que se basaron, en una extensiva investigación utilizando la evaluación cuantitativa de datos fenotípicos, rehibridación, electroforesis enzimática de multilocus, secuenciación de 16Sr DNA e hibridación de DNA-DNA. *M. haemolytica* (incluye cepas de referencia de los serotipos 1, 2, 5-9, 12-14 y 16 en su mayoría serotipo A siendo todos L-arabinosa negativos). Solo fueron cepas aisladas de rumiantes las que mostraron afiliación genética a *M. haemolytica* y *M. glucosida* que incluye al serotipo A11. Esta especie es fenotípicamente heterogénea, aunque todas las cepas mostraron actividad a la β -glucosidasa. La mayoría de las cepas, se aislaron de cavidad nasal de borrego e incluso algunas cepas se recuperaron de animales con neumonía o en otras condiciones de enfermedad. *M. granulomatis* aislada de ganado bovino y especies leporidas. Esta especie ha sido asociada con neumonía y conjuntivitis purulenta en leporidos y con granulomas en piel, así como otras condiciones de enfermedad en el ganado; *M. ruminalis*, consiste de cepas no hemolíticas aisladas del rumen de ganado bovino y ovino, a las cuales no se les asocia a condiciones de enfermedad y *M. varigena* aislada de bovinos y porcinos, la cual ha sido asociada con sepsis, neumonía y otros estados de enfermedad.¹⁴

De *M. haemolytica* se han reconocido, por hemaglutinación indirecta, 17 serotipos de acuerdo a antígenos capsulares solubles.^{15,16} Estos antígenos son básicamente polisacáridos y lipopolisacáridos con capacidad antigénica alta.¹² Se han identificado también dos diferentes biotipos de *M. haemolytica* de acuerdo a diferencias en la fermentación de azúcares.¹⁷ Los serotipos

1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16 y 17 corresponden al biotipo A que fermenta principalmente arabinosa y los cuales están asociados a producir neumonía, mientras que el biotipo T fermenta a la trealosa e incluye a los serotipos 3, 4, 10 y 15, causantes de septicemia.¹⁸

El serotipo A1 es el más comúnmente aislado de casos clínicos de pasteurelosis neumónica bovina. En ovinos el serotipo más importante a nivel de mucosa respiratoria 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.¹⁹ Los estudios realizados en México han demostrado la mayor importancia de los serotipos A1, A2, A5 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos.²⁰

Algunos serotipos de *M. haemolytica* forman parte de la microbiota normal de la cavidad nasofaríngea de los rumiantes, pero bajo situaciones que alteran los mecanismos de defensa pulmonar del hospedador logran establecerse en el aparato respiratorio bajo y causar daño al tejido pulmonar. En la presentación de la enfermedad intervienen diversos factores predisponentes, que son determinantes en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo, las condiciones ambientales adversas y la mala alimentación de los animales pueden favorecer al complejo respiratorio.²¹ También se ha demostrado la participación de agentes primarios de tipo viral como adenovirus, virus respiratorio sincicial y parainfluenza 3, capaces de iniciar la enfermedad.^{22,23}

I.3 Patogenia de la Pasteurelosis Neumónica.

A pesar de numerosos estudios, hace falta aún estudiar más acerca de la fisiopatología multifactorial de la pasteurelosis neumónica, también conocida como complejo neumónico en los ovinos y de los eventos que conducen al estado final de la enfermedad clínica.²⁴

El tracto respiratorio superior está expuesto, al aire del medio ambiente (frío, humedad, amoníaco y numerosos agentes infecciosos). Su principal función es calentar y humedecer el aire antes de que éste, llegue al pulmón. Los estados patológicos del tracto respiratorio alto (congestión y edema), reducen el intercambio así como el radio por el cual fluye el aire, ocasionando un incremento en la resistencia. Además de producirse fluctuaciones en el medio ambiente que pueden alterar la anatomía de la mucosa nasal. La velocidad del aire se incrementa y los mecanismos que normalmente remueven patógenos aerógenos, así como también regulan la

temperatura del aire y lo mantienen con cierta humedad, se ven alterados. *M. haemolytica* constituye una pequeña porción de la flora saprofita de la nasofaringe de ganado sano. Bajo ciertas circunstancias tanto del hospedador, como del medio ambiente, las bacterias colonizan el tracto respiratorio. El estrés del transporte, partos e infecciones concurrentes respiratorias de tipo viral, pueden favorecer la colonización del tracto respiratorio y de esta manera contribuir al desarrollo de la enfermedad.²⁵⁻²⁷

Además de que las enfermedades crónicas de las tonsilas por diferentes especies de *Pasteurella* pueden ser fuente importante de patógenos durante las condiciones que conducen a la forma clínica de la enfermedad.²⁸ Cuando el hospedador se encuentra bajo situaciones de estrés *M. haemolytica* prolifera y es eliminada por las secreciones nasales en aerosoles;²⁹ la bacteria ingresa en los mismos, al animal sano favoreciendo el movimiento de la bacteria a zonas más profundas, hacia el árbol bronquial proliferando rápidamente a nivel alveolar.³⁰

La neumonía causada por *M. haemolytica*, se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa severa. Sin embargo, se ha logrado aislar éste agente de cuadros neumónicos que varían en cuanto a su severidad, distribución y morfopatología. Se pueden encontrar desde neumonías supurativas focales y difusas, hasta cuadros donde existen lesiones vasculares con trombosis y hemorragias, en los que adicionalmente los macrófagos se transforman y su núcleo se alarga, con aspecto de grano de avena y se agrupan formando ondas y remolinos. Es posible que los diversos cuadros sean ocasionados por cepas con propiedades patogénicas diferentes.³¹

Las especies de *Mannheimia* pueden expresar una gran cantidad de potentes antígenos de superficie incluyendo lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PMH), fimbrias y polisacáridos capsulares. Estas bacterias secretan una citolisina específica para leucocitos denominada leucotoxina. La expresión de los diferentes antígenos ocurre en distintas condiciones de crecimiento. Esto aumenta la posibilidad de que la expresión de antígenos puede estar alterada *in vivo* y contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Cada uno de estos antígenos probablemente contribuye a la enfermedad clínica, en combinación con las secreciones y componentes celulares que favorecen la presentación característica de la enfermedad así como los cambios histopatológicos asociados al proceso. Dos mecanismos importantes en la inmunidad de los bovinos hacia *M. haemolytica*, están mediados por el complemento, la opsonización de la bacteria y la fagocitosis por neutrófilos.²¹

La neumonía aguda intersticial y exudativa, es considerada la más representativa del complejo respiratorio bovino, cabe mencionar que también se hace referencia a ella como pleurobronconeumonía fibrinopurulenta, en la clasificación anatomopatológica. Lo anterior se debe a que su respuesta inflamatoria exudativa es predominantemente de tipo fibrinosa. Este exudado cubre la pleura de las regiones craneoventrales del pulmón; además, también existe una patente consolidación en estas zonas. La lesión es por lo general asimétrica y se presenta un daño más considerable en el pulmón derecho. Comúnmente se involucran los lóbulos craneales y cardíacos de ambos lados del pulmón, el lóbulo accesorio y la parte adyacente del diafragmático del pulmón derecho. Eventualmente, cuando la lesión ha evolucionado por algún tiempo, se aprecian adherencias de fibrina entre la pleura parietal y la visceral. Las secuelas más comunes son sequestros abscedados de las zonas más dañadas. ²⁴

Microscópicamente se observa una severa pleuritis fibrinosa o fibrinopurulenta. Los vasos linfáticos de los septos interlobulillares muestran trombos de fibrina. Los bronquios y bronquiolos mayores lucen necrosis y descamación del epitelio y ocasionalmente, un exudado fibrinopurulento. Los septos alveolares parecen engrosados y hemorrágicos; asimismo, se aprecia una infiltración severa de leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), tanto en septos, como participando en la exudación a la luz alveolar. En zonas de daño severo la consolidación y la necrosis no permiten distinguir la arquitectura alveolar. Estas zonas de intenso daño se encuentran parcialmente demarcadas por células necróticas arremolinadas. En estas zonas pueden también apreciarse vasculitis y trombosis de algunas pequeñas venas. En otras áreas, con menos daño, se puede reconocer edema, fibrina, macrófagos activos y neutrófilos en la luz de los alveolos, además, pueden identificarse colonias bacterianas. ²⁴

Como se ha visto, las bacterias son en sí las principales responsables del daño pulmonar, sin embargo, eventualmente pueden identificarse evidencias de la participación viral en la lesión. Estas evidencias corresponden a la formación de cuerpos de inclusión que se presentan en el citoplasma de las células del epitelio bronquial y bronquiolar, así como en macrófagos, lo que resulta compatible con infecciones por Adenovirus. Además, en estos casos también se aprecia a nivel alveolar la coalescencia de células del epitelio o de macrófagos, a las que se les denomina sincicios, muy posiblemente asociados a virus respiratorio sincicial bovino o virus de la Parainfluenza. Los agentes virales como el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (herpesvirus 1), parainfluenza-3 y el virus respiratorio sincicial bovino, además de causar un efecto citopático

directo en el aparato respiratorio, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar con lo cual se facilita la colonización pulmonar por *Mannheimia*.^{32,34}

Interacción Virus-bacteria.

Se sabe que el macrófago alveolar juega el papel más importante en la defensa del pulmón contra infecciones bacterianas, por lo que en algunos estudios se determinó que la proliferación bacteriana en el pulmón, se debe a anormalidades en la ingestión e inactivación intracelular de bacterias por parte del macrófago alveolar. Por ejemplo se sabe que macrófagos alveolares infectados con virus muestran disminución de receptores en su membrana celular para la porción Fc de IgG, IgM así como para la porción C3b del complemento, con lo cual no pueden utilizar eficientemente a estas opsoninas. Sin embargo, se sabe ahora que esta disfunción temporal del macrófago alveolar, no se debe exclusivamente a la infección viral. Estudios con anticuerpos fluorescentes indicaron que el antígeno viral se localiza en el árbol respiratorio en las estapas agudas de la infección viral, para después situarse en los macrófagos alveolares. Esto se debe a que los macrófagos alveolares fagocitan restos de células epiteliales contaminadas con virus con lo cual pueden infectarse.³⁵

Aspectos Inmunológicos.

La respuesta inmune del bovino contra esta bacteria se lleva a cabo mediante los mecanismos de inmunidad celular y a través de la inmunidad humoral. Con respecto a la primera, los linfocitos T, pueden ser directamente tóxicos a la bacteria o incrementar la destrucción intracelular de bacterias por medio de la activación de macrófagos inducida por citocinas. Por otro lado, se encuentra la acción protectora de la IgA que inhibe la colonización bacteriana en la mucosa respiratoria. En la pasteurelosis, la inhibición de la colonización del aparato respiratorio superior mediante la acción de la IgA, no ha sido estudiada con el detalle requerido.³⁶

Otro mecanismo inmunológico de protección contra *M. haemolytica* es la opsonización de la bacteria por anticuerpos específicos del suero y de las secreciones respiratorias como IgG e IgM, que facilitan el proceso de fagocitosis por los macrófagos alveolares y los neutrófilos. Otra forma importante de destrucción de esta bacteria, es mediante la acción directa del complemento.³⁶

Es de gran importancia la neutralización de la leucotoxina de *M. haemolytica* mediante anticuerpos presentes en el suero o en las secreciones broncoalveolares. Esto se debe a que la leucotoxina destruye a los leucocitos de los rumiantes y por eso, si el hospedador cuenta con anticuerpos antileucotoxina, puede repercutir en una mayor resistencia pulmonar a la infección.³⁷

Los estudios de crecimiento de bacterias del grupo HAP (*Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*) en el laboratorio, han aportado información importante en cuanto a sus requerimientos nutricionales, estructuras y productos celulares, pero se requiere de un modelo de infección, en el cual las bacterias entren en interacción con el hospedador y expongan sus componentes y ocurra la respuesta al hospedador; citocinas, enzimas, anticuerpos y productos tóxicos de oxígeno.³⁸

Estudios con *Pasteurella multocida* en pavos, demostraron cambios moleculares que ocurren cuando esta bacteria crece en el hospedador. Heddleston y Rebers en 1972, demostraron que una bacterina preparada con células de *P. multocida* recuperada de sangre de pavo los protegía de desafíos heterólogos. Esto indica que los antígenos expresados en estas células se encontraban ausentes en los crecimientos celulares en el laboratorio.³⁹

II. FACTORES DE PATOGENICIDAD.

II.1. Leucotoxina.

La *M. haemolytica*, produce una gran cantidad de factores de virulencia que son capaces de evadir los mecanismos de defensa del hospedador. Aunque todos ellos juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, solo uno de ellos, la leucotoxina (LKT) es extracelular y es probablemente el factor de virulencia más importante. Esta conclusión es sustentada por los hallazgos observados en el ganado desafiado con cepas de campo de *M. haemolytica* donde se observan muertes con diferentes grados de lesión en el pulmón, en comparación con el ganado desafiado con cepas mutantes de *M. haemolytica*, las cuales fueron completamente deficientes en su producción de LKT pero no de otros factores de virulencia.⁴⁰

Esta leucotoxina es una proteína de 104 kD sintetizada y excretada por *M. haemolytica* durante su fase de crecimiento logarítmico.^{41,42} Esta leucotoxina es un miembro de la familia de las toxinas RTX.⁴³ La actividad citolítica de las toxinas RTX es dependiente de calcio.^{44,45,46} Las toxinas

RTX lisan células blanco mediante la formación transmembranal de poros.^{47,48,49} Muchas toxinas RTX, incluyendo la LKT de *M. haemolytica*, son también potentes estimuladores de leucocitos cuando están presentes en bajas concentraciones, induciendo la expresión de citocinas proinflamatorias, que favorecen la severidad de las lesiones, tal es el caso del leucotrieno B₄ (LTB₄), el cual es un importante agente quimiotáctico para leucocitos polimorfonucleares en el desarrollo de la neumonía fibrinopurulenta aguda del ganado.⁵⁰⁻⁵⁸

Los genes que se expresan para la síntesis de la leucotoxina se encuentran concentrados en un operón. Este operón cromosómico lktCABD, utiliza un patrón de síntesis y secreción de LktA parecido a la α -hemolisina (Hly) de *E. coli*. Los cuatro genes lktC, lktA, lktB y lktD, codifican proteínas de 20 kD, 102 kD, 80 kD y 55 kD, respectivamente. También ha sido demostrado que la HlyB y la HlyD, pueden acoplarse a la secreción de LktA, cuando la leucotoxina es expresada en *E. coli*. Además, la LktA puede ser activada por la HlyC de *E. coli* sin alterar la actividad específica a las células blanco de la LktA.⁵⁰⁻⁵⁸

El gen lktA representa el precursor inactivo de la proteína tóxica con la actividad de la leucotoxina madura, la LktC es una proteína citoplasmática de 102 KD, la cual es requerida para la activación postranslacional de la lktA a la forma activa de la leucotoxina. Las proteínas que se codifican por la lktB (LktB de 80kD) y la lktD (LktD de 55kD) son esenciales para la secreción extracelular de la leucotoxina.⁵⁰⁻⁵⁸

Esta leucotoxina (LktA), produce daño específico en leucocitos de rumiantes,⁵⁹⁻⁶³ exhibiendo solo una leve actividad hemolítica contra eritrocitos en esta especie. La LktA parece jugar un papel importante en la patogénesis de la infección por *M. haemolytica*. Se presume que esta función es destruir leucocitos, principalmente macrófagos alveolares, en el sitio de infección, lo cual reduce la capacidad del hospedador de establecer una respuesta inmune eficiente, induciendo eventos de inflamación que desencadenan un severo daño al pulmón. En adición a ésto, las enzimas liberadas por los leucocitos lisados en el tejido pulmonar, contribuyen a la severa necrosis observada en las infecciones por *M. haemolytica*. La leucotoxina por si misma, no es tóxica para el epitelio bronquial; la severidad de las lesiones en los septos alveolares depende en su mayor parte de la acumulación de leucocitos.⁶⁴

Estudios previos han mostrado que la estimulación a los neutrófilos de bovino por la leucotoxina resulta en una elevación de calcio intracelular por influjo de éste desde el medio, a través de canales de entrada con carga.⁵³ Hallazgos similares se han descrito en neutrófilos de humano por leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.⁴³

El influjo de calcio dentro de las células induce, 1) activación de fosfolipasa, liberación del factor activador de plaquetas y ácido araquidónico con la subsecuente formación de lípidos vasoactivos y quimiotácticos; 2) activación del estallido respiratorio y degranulación; y 3) inducción de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL1) y el factor de necrosis tumoral (FNT). Si se diera un influjo de calcio, la membrana de la célula, pierde su integridad como resultado de la continua degradación de fosfolípidos. Existe evidencia de que el influjo de calcio permite la activación de la célula y posteriormente la muerte de la misma.⁶⁵

Aunque estos estudios indican que la respuesta del calcio intracelular a la leucotoxina podría ser un evento temprano durante la activación de leucocitos, los caminos precisos que conducen a la respuesta del calcio intracelular no han sido claramente entendidos.^{55,59,60}

Las lesiones pulmonares causadas por infección de *M. haemolytica* se caracterizan también por un extenso infiltrado de neutrófilos y exudación de fibrina en los conductos alveolares. Además, *M. haemolytica* por sí sola es capaz de producir sustancias solubles que son directamente quimiotácticas para leucocitos de bovinos. La quimiotáxis de neutrófilos así como su incapacidad por detener la infección, son efecto de la acción directa de la LKT, quien causa lisis de leucocitos y plaquetas. La exposición de los neutrófilos de bovino a bajas concentraciones de LKT, estimula la liberación de eicosanoides quimiotácticos, como el leucotrieno B₄ (LTB₄). Estudios previos reportan que la LKT-induce la síntesis de LTB₄ en neutrófilos de bovino, los cuales correlacionaron estrechamente con el daño a la membrana y la lisis celular.⁶⁶

En adición a otros mediadores inflamatorios, se incluyen productos liberados por leucocitos que pueden inducir la migración de leucocitos. Estos son productos de la 5-lipoxigenasa del ácido araquidónico e incluyen al LTB₄ y al ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico, que son potentes agentes quimiotácticos. Se sabe que estos agentes inducen el reclutamiento de células, además de exacerbar los eventos inflamatorios en las lesiones microvasculares.⁶⁶

Los mecanismos inducidos por la leucotoxina, mediante los cuales se activan los leucocitos, no han sido totalmente determinados, pero es requerido un incremento en el calcio intracelular. Se han realizado estudios asociados al fenómeno de apoptosis celular en relación a algunas bacterias patógenas que intentan utilizar la apoptosis como una arma más sobre las respuestas del hospedador. Recientemente, muchos investigadores han descrito que ciertas toxinas RTX pueden inducir en las células blanco un proceso de apoptosis. La habilidad de estas toxinas bacterianas, de inducir a bajas concentraciones la muerte celular de leucocitos, puede jugar un papel significativo en la iniciación y persistencia de la infección, dándole al patógeno diversas ventajas en la batalla contra los mecanismos de respuesta del hospedador.⁶⁷

Inicialmente Shewen y Wilkie en 1985,⁶⁸ informaron que los serotipos 2 al 12 producían citolisinas que estaban inmunológicamente relacionadas a la leucotoxina del serotipo A1. Mientras que Lori y colaboradores en 1987, confirmaron los estudios realizados por Shewen y Wilkie en 1985, incluyeron datos en sus investigaciones de los serotipos 13 al 16, los cuales fueron recientemente descritos, demostrando que las toxinas están tanto inmunológica como funcionalmente relacionadas en estos serotipos. Esto ha sido demostrado por estudios similares a los realizados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la cual tiene 4 diferentes determinantes en la familia RTX, distribuidos entre sus 15 serotipos. Los datos de Shewen y colaboradores, mostraron que los 16 serotipos de *M. haemolytica* tienen relación entre ellos, pero no son idénticos, determinándose, al menos siete diferentes variaciones en la LKT de los 16 serotipos de *M. haemolytica*. Los determinantes genéticos que codifican a la leucotoxina y las proteínas que requiere para su activación y secreción, han sido clonados en el serotipo 1 y caracterizados.⁶⁹

La leucotoxina inhibe la expresión de las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad en monocitos y macrófagos, reduciendo su capacidad para presentar antígenos al linfocito T cooperador; además concentraciones sublétricas inhiben la transformación blastoide de linfocitos.⁷⁰ Los efectos que la leucotoxina induce por la activación y destrucción de células inmunocompetentes guarda más relación con la sobrevivencia de la bacteria en el sitio de infección, que con el daño al endotelio vascular donde su efecto no es directo, sino que es consecuencia de esta activación.^{71,72}

Muchas propiedades se han asociado a toxinas del grupo RTX, donde se incluye a la leucotoxina de *M. haemolytica*, con su actividad citotóxica a varias células del sistema linfoide y no linfoides, así como también su habilidad para modular la actividad inmunológica de linfocitos y

monocitos. El conocimiento de los mecanismos inmunológicos que confieren protección contra *M. haemolytica*, ha sido de gran importancia para tratar de desarrollar mejores productos biológicos que prevengan la infección.⁷³

La vacunación de bovinos con *M. haemolytica* viva serotipo A1 ó con sobrenadante de cultivo libre de bacterias en fase de crecimiento logaritmico induce resistencia en el desafío experimental.⁷⁴ Estos sobrenadantes de cultivo contienen un número de antígenos solubles incluyendo leucotoxina específica contra células de rumiantes^{61,62}, glicoproteasas⁷⁵⁻⁷⁷ neuraminidasa^{77,78} y otros materiales solubles liberados durante el crecimiento bacteriano.

Se ha desarrollado una vacuna con sobrenadante de cultivo de *M. haemolytica* serotipo A1 la cual ya se ha comercializado, obteniendo excelentes resultados en cuanto a protección se refiere principalmente contra la LKT de dicha bacteria.⁷⁹

II.2. Lipopolisacárido.

Otro de los factores de virulencia de *M. haemolytica* es el lipopolisacárido, el cual ha sido mejor estudiado en el serotipo A1 y comprende del 10 al 25% del peso seco de la bacteria. Presenta el lípido A, una región central compuesta de Hex-Hep-ac2-ceto-3-deoxioctulosónico y un polisacárido somático o unidades trisacáridas repetitivas de dos residuos de D-galactosa y un residuo de N-acetil-D-galactosamina.⁸⁰ El LPS se encuentra generalmente asociado a la célula bacteriana, pero en las infecciones ha podido detectarse en forma libre en las lesiones pulmonares.⁸¹ Al LPS se le considera como uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria. Las lesiones que induce, constan de grandes áreas de hiperemia y edema que abarcan zonas de deposición de células inflamatorias invadiendo en ocasiones lóbulos adyacentes, además pueden observarse también focos de hemorragia y adherencias fibrinosas.⁸²

Usando técnicas de inmunohistoquímica, se ha podido mostrar que la endotoxina es liberada dentro del exudado inflamatorio y se localiza: 1) en neutrófilos, en los alvéolos, intersticio, y en el lúmen capilar; 2) dentro de macrófagos alveolares; 3) en células endoteliales y 4) en la superficie de células epiteliales. Resultados similares fueron descritos cuando la endotoxina se administró en ratas vía endovenosa.⁹

Se ha demostrado también que cepas de *M. haemolytica* A1 muertas, administradas intratraquealmente, o purificados de LPS de la misma cepa administrados intrabronquialmente, son capaces de causar exudación de neutrófilos y fibrina, edema pulmonar así como agregación de neutrófilos en capilares. Cambios similares han sido también observados en borregos, donde se les ha administrado vía endovenosa o intrabronquial, así como en hámsters, cuyes, ratas y conejos, a los que se les ha administrado la endotoxina por inhalación ó deposición intrabronquial.⁹

Microscópicamente se observa, que el LPS, induce el influjo de neutrófilos, exudación de fibrina, edema en los espacios alveolares, agregación de plaquetas y neutrófilos en los capilares; estos eventos son consecuencia del daño al endotelio vascular inducido por el macrófago activado y la liberación de mediadores proinflamatorios, FNT, IL-1, leucotrienos y ácido araquidónico.^{81,83-87}

Los mecanismos de acción de la endotoxina a nivel celular y en general en el resto del organismo han sido extensamente estudiados y resultan muy complejos. El lípido del LPS tiene la capacidad de activar proteasas séricas y éstas a su vez activar el factor Hageman y el primer componente de la vía clásica del complemento. El componente polisacárido del LPS puede activar la vía alterna del complemento. La activación del factor Hageman permite la activación de la cascada de la coagulación, el sistema de las cininas y del plasminógeno. Éste sistema es capaz de producir numerosos factores proinflamatorios activando componentes celulares de la inflamación. El lipopolisacárido puede entrar a muchas células interactuando con receptores específicos a través del núcleo del polisacárido, o por inserción de una porción del lípido A de la molécula.⁹

En algunos estudios se ha realizado la caracterización de los lipopolisacáridos de los 16 diferentes serotipos de la bacteria. El análisis mostró que los serotipos 2 y 8 carecen de la cadena O-polisacáridica, indicando con ello que el lipopolisacárido de estos serotipos es de tipo rugoso, mientras que los otros 14 serotipos presentan un patrón característico de lipopolisacárido tipo liso. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear reveló que el polisacárido de la cadena-O, de los serotipos 1, 6 y 9 es idéntico, y por análisis de inmunotransferencia se encontró que muchos de los serotipos del biotipo A, portan epitopos comunes en su cadena-O; además, se demostró que los polisacáridos de la cadena-O de los serotipos 3 y 15 del biotipo T, así como aquellos de los serotipos 4 y 10, son idénticos.⁸⁸

En cuanto a la composición de los monosacáridos de la región nuclear, ésta es muy similar en los serotipos 1, 6, 8, 9 y 12 del biotipo A, los oligosacáridos contienen cantidades molares iguales de D-glucosa, D-glicero-D-mano-heptosa y L-glicero-D-mano-heptosa. La composición de los monosacáridos de esta región en los serotipos del biotipo T, difiere de los del biotipo A, ya que estos contienen L-ramnosa, D-glucosa, D-galactosa, D- y L-glicero-D-mano-heptosa.⁸⁸

El lipopolisacárido y la cápsula de *Mannheimia*, desempeñan un papel crítico como interfases principales, entre el microorganismo y la célula huésped, razón por la cual muchas investigaciones tienen el propósito de evaluar las interacciones que se establecen entre la bacteria y su ambiente a un nivel estructural y funcional.

En algunos estudios, se observó que el polisacárido capsular del serotipo A1 interactúa con el surfactante alveolar *in vitro*, causando una reacción de precipitación en la que intervienen azúcares N-acetilados. Cuando se trató de identificar la especificidad de esta interacción, se encontró que el surfactante reaccionaba fuertemente con N-acetil-glucosamina, y en menor grado con N-acetil-galactosamina, pero no presentaban ningún efecto con N-acetil-manosamina, uno de los constituyentes del polisacárido capsular. La interacción de este componente bacteriano con el surfactante *in vivo* no produce cambios fisiopatológicos importantes que conduzcan a daño del tejido pulmonar, pero se cree pueden tener una interacción tipo receptor-adhesina, involucrada en la adhesión de las bacterias al epitelio alveolar.⁸⁹

Las cepas que pertenecen al biotipo T, tienen la característica de un LPS de tipo liso, mientras que el LPS de algunas cepas del biotipo A, ha sido reportado de forma rugosa. La estructura química de la cadena-O de cepas de serotipos T3, T4 y T10, ha sido determinada, pero el LPS de las cepas del biotipo A, ha sido menos caracterizado. En adición, se han descrito diferencias sobre la región de bajo peso molecular de los dos serotipos aislados, sugiriendo variación entre los serotipos.⁹⁰

Se sabe que tanto la leucotoxina (exotoxina) como el LPS (endotoxina) inducen la expresión de genes para citocinas proinflamatorias, incluyendo la IL-1 y FNT en los macrófagos alveolares de bovino.^{87,91} Aunque los perfiles son similares en los genes de las citocinas proinflamatorias, éstos al expresarse en respuesta a la leucotoxina y el LPS, muestran marcadas diferencias en la cinética de expresión, y transducción.⁹² En macrófagos de diferentes especies, el LPS, ha mostrado estimular la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa D, resultando en la producción de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃)

y diacilglicerol (DAG).^{55,58,60} Ha sido bien establecido que el IP₃ estimula la liberación de calcio de las reservas intracelulares en diferentes tipos de células.^{56,58} Sin embargo, existen conflictos en cuanto a la información de los papeles que juega el IP₃ y el DAG en la movilización del calcio intracelular por LPS en macrófagos.^{93,59}

II.3. Proteínas de Membrana Externa.

Varios componentes antigénicos de *M. haemolytica* han sido estudiados para determinar si estos resultan importantes en estimular una respuesta inmune protectora en el ganado. Utilizando vacunas que contienen leucotoxina y material capsular se ha documentado que se logra una protección parcial contra la inducción experimental de la enfermedad.^{74,94,95}

Las proteínas de membrana externa (PME), son potenciales candidatos como inmunógenos, especialmente aquellas que se exponen en la superficie.^{96,97} El uso de sobrenadantes de cultivo en fase de crecimiento logarítmico de *M. haemolytica* A1, han sido utilizados como vacuna, reportando que aumentan la resistencia a la pastorelosis neumónica, específicamente contra este serotipo.^{94,95}

Aunque el sobrenadante contiene una gran cantidad de leucotoxina, otros componentes aparte de ésta, representan inmunógenos importantes. El suero de animales inmunizados con sobrenadante, permite aglutinar células completas de *M. haemolytica*, lo cual indica que algunos componentes de la misma liberados durante el desarrollo de la bacteria, son probablemente antígenos de superficie celular solubles, comúnmente de la membrana externa y la cápsula.⁷⁴

Las proteínas de membrana externa de las bacterias Gram negativas tienen un importante papel en el proceso de infección. Algunas proteínas de membrana externa (PME) tienen función de porinas que permiten el transporte de sustancias a través de la membrana externa, mientras que la fosfolipasa A, una PME de las bacterias gram negativas, es esencial en ciertos patógenos para la invasión a las células del hospedador. Otras PME pueden actuar como receptores de alta afinidad para obtener hierro del hospedador.⁹⁸

Se sabe además que las proteínas de membrana externa aisladas de *M. haemolytica* inducen alteraciones en la actividad biológica de los leucocitos polimorfonucleares. A dosis dependientes, se

observó que reducen la capacidad de adherencia a la pared de nylon y actúan como quimiotactinas a concentraciones de entre 5 y 20 ug/ml.⁹⁹

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

Estas proteínas reguladas por hierro, se encuentran involucradas en adquirir hierro del ambiente, el cual es un nutriente esencial para la supervivencia de todas las células, pero la disponibilidad de hierro en el tejido de un animal infectado, esta restringida por proteínas ligadoras de hierro, propias del hospedador. Las proteínas reguladas por hierro de las bacterias, trabajan específicamente compitiendo con éstas proteínas del hospedador, para quitarles el hierro. Sin proteínas reguladas por hierro, la célula bacteriana no podría adquirir suficiente hierro para multiplicarse, crecer y sería muy fácil removerlas por parte del hospedador.¹⁰⁰

La mayoría de las bacterias gram negativas tienen aproximadamente 20 PME, pero en algunas de éstas, se encuentran presentes de 4 a 6 PME principales, que constituyen una gran parte del contenido proteico de la membrana externa.¹⁰¹

Se sabe que hay estimulación del sistema inmune por las PME, porque la bacteria se adhiere a las células del hospedador para evitar ser más fácilmente fagocitada, dañando de ésta forma la función de la membrana celular.⁹⁸ Las PME de las bacterias gram negativas podrían ser elementos importantes para la elaboración de vacunas, ya que desarrollan y estimulan una respuesta inmune protectora y de resistencia a la pasteurelosis neumónica, al exponerse en la superficie de la bacteria, siendo así potenciales blancos para el sistema inmunológico del hospedador, desencadenando respuestas de fijación de complemento y de opsonización por anticuerpos.¹⁰²

En estudios donde el ganado fue vacunado con proteínas reguladas por hierro (PRH) de 70, 77 y 100 kDa, los títulos de anticuerpos séricos no correlacionaron con la resistencia a la infección, pero los anticuerpos contra estas proteínas, en conjunción con los anticuerpos a otros antígenos de superficie, aumentaron la respuesta inmune.¹⁰³ Existe incluso evidencia de que algunas de estas proteínas son conservadas entre los diferentes serotipos de *M. haemolytica* y tal vez éstas podrían proveer de alguna protección cruzada.^{102,104,105}

Existen estudios que indican que los anticuerpos contra las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* juegan un papel muy importante en la inmunidad contra la Pasteurelisis neumónica del ganado, ya que son de los antígenos más importantes en la estimulación de la resistencia a dicha enfermedad según Morton y colaboradores, en 1990, 1994 y 1995, Moiser y colaboradores, en 1989, junto con la revisión de Confer en 1993; indican una correlación estadísticamente significativa, entre la resistencia a la pasteurelisis neumónica y la presencia de anticuerpos séricos, dirigidos contra una gran cantidad de proteínas presentes en extractos salinos de toda la célula bacteriana.¹⁰⁶

En otros estudios se clonaron y secuenciaron los genes que codifican la lipoproteína de 38 kDa (Lpp38) de *M. haemolytica* similar a la PotD (poliamina transportadora de proteínas) de *E. coli*, presente, tanto en la fracción de membrana externa, como en la interna de la envoltura celular. La susceptibilidad de la Lpp38 a la acción de proteasas extracelulares indica que cierta porción de la proteína se encuentra expuesta en la superficie. Una proteína de peso molecular similar, en cepas de *M. haemolytica* biotipo A y 12 cepas no tipificables, fue detectada mediante anticuerpos monoclonales, siendo reconocida por el suero de ganado resistente a la infección después de la exposición natural a *M. haemolytica* y por el suero de ganado protegido contra la infección mediante vacunación con proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* serotipo A y con la bacteria viva. Las regiones de la Lpp38, que se exponen en la superficie de la bacteria, podrían ser blanco de mecanismos inmunes dependientes de anticuerpos en el bovino. Estos datos sugieren el papel que juega esta proteína en el desarrollo de la inmunidad contra la infección ocasionada por *M. haemolytica*.¹⁰⁷

En el Instituto Moredum, se desarrolló un modelo de pasteurelisis ovina utilizando corderos libres de patógenos, que permitían la reproducción confiable de neumonía en los animales. Las células bacterianas recuperadas a partir de fluidos de pleura fueron examinadas por SDS- PAGE e "inmunoelctrotransferencia". Gran cantidad de nuevos antígenos fueron identificados, los cuales

eran expresados *in vivo* en estas áreas, como las proteínas reguladas por hierro que podrían tener relación al inducir su expresión en el laboratorio, en medios en los cuales el hierro era eliminado haciéndolo invariable. La expresión de éstas fue confirmada por otros autores en aislamientos de *M. haemolytica* en el ganado.¹⁰⁸

Una gran cantidad de proteínas de membrana externa, las cuales son expresadas *in vivo*, son directamente recuperadas del tejido pulmonar, tejido subcutáneo o cámara peritoneal. El mayor interés ha sido ligado a los antígenos de superficie, los cuales son considerados como potenciales inmunógenos protectores. Numerosos estudios han caracterizado antígenos de superficie de *M. haemolytica* y la mayoría de estos se encuentran regulados por hierro.¹⁰⁹

Los antígenos asociados a la fracción de membrana externa de *M. haemolytica*, a partir de cepas *in vivo* permiten una adecuada inmunidad protectora, mientras que las cepas que crecieron *in vitro* solo confieren un protección homóloga. Concluyendo que los antígenos expresados en la membrana externa *in vivo* son importantes contra la inmunidad de la pastereiosis neumónica.^{39, 110-111} Se piensa las PME son los principales antígenos involucrados en inducir una respuesta protectora, ya que la inoculación con LPS exclusivamente, se ha observado que solo induce una protección parcial.¹¹²

III. JUSTIFICACIÓN.

Las bacterias patógenas pueden modular la expresión de componentes celulares en respuesta al medio ambiente que les rodea. Para el grupo de organismos HAP (*Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*), el medio ambiente podría ser tan diverso como el tejido inflamado ó normal del pulmón, la mucosa ó el aparato respiratorio superior. Entender como la bacteria responde, sobrevive, crece e interactúa con su hospedador en ese habitat, permitirá comprender el proceso patogénico e intervenir con vacunas y quimioterapéuticos en las neumonías que causan las bacterias de este grupo.

IV. HIPÓTESIS.

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica expresa diferentes antígenos, en particular de membrana externa, en distintas condiciones de crecimiento, de la misma manera esta expresión antigénica puede modificarse en la forma natural de la enfermedad y en desafíos experimentales; y cada uno de éstos antígenos puede contribuir en forma diferente ó en interacciones a la patogenia de la enfermedad e inducir una respuesta inmune distinta en cada condición.

V. OBJETIVOS GENERALES.

1.- Determinar la respuesta de anticuerpos contra antígenos de *M. haemolytica* mediante diferentes técnicas en corderos clínicamente enfermos de neumonía, en los Convalecientes del proceso, así como en animales sanos y desafiados experimentalmente.

2.- Establecer la existencia de diferencias en la respuesta inmune contra los distintos antígenos, en las diversas condiciones de enfermedad del hospedador.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Obtener suero de animales con neumonía clínica, Convalecientes del proceso así como de sanos, al igual que de animales desafiados experimentalmente para evaluar su respuesta a antígenos de *M. haemolytica*.
- 2.- Aislar, caracterizar y serotipificar *M. haemolytica* de pulmones con lesiones neumónicas de corderos muertos por el proceso.
- 3.- Producir leucotoxina a partir de los aislamientos de *M. haemolytica*, para su posterior utilización en la técnica de ensayo visual simple para determinar la presencia de anticuerpos anti-leucotoxina del suero de animales enfermos, Convalecientes del proceso neumónico, sanos y desafiados experimentalmente para determinar la presencia de anticuerpos anti-LKT.
- 4.- Separar proteínas de membrana externa por electroforesis, para utilizarlas como antígenos en la técnica de inmunoelectrotransferencia y determinar el patrón de reconocimiento por anticuerpos contra éstos antígenos en los diferentes grupos muestreados.
- 5.- Realizar estudios histopatológicos de pulmones que presenten lesiones significativas de pasteurelosis neumónica.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

VII.I FASE DE CAMPO.

VII.1. Material Biológico.

Los estudios se realizaron con corderos que desarrollaron cuadro clínico de neumonía, que presentaban aumento de la frecuencia respiratoria y cardiaca a la auscultación, a nivel de campos pulmonares, se escuchaban estertores o roces pleurales, así como salida de moco a través de los orificios nasales y fiebre de 39.6 C a 41.6 C. Los animales procedían de explotaciones con alta incidencia de la enfermedad. Se les clasificó como grupo de ENFERMOS. Se les tomaron muestras de sangre para obtener el suero y determinar la presencia de anticuerpos contra los diferentes antígenos de *M. haemolytica* que se expresaran en ese momento, principalmente leucotoxina (LKT) y proteínas de membrana externa (PME). Se realizó un segundo muestreo a los quince días, de aquellos animales ENFERMOS que se recuperaron del proceso, clasificando este segundo muestreo como grupo de CONVALECIENTES. También se muestrearon animales clínicamente sanos seleccionados aleatoriamente del hato, clasificando este grupo como SANOS; para determinar los anticuerpos contra los antígenos ya mencionados.

VII.2. Muestréos serológicos de animales en campo.

Los corderos evaluados en los distintos grupos procedían de las siguientes zonas:

- 1) Jilotepec, Edo. Mex.
- 2) Jaltenco, Edo. de Méx.
- 3) FES-C UNAM (Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.)
- 4) Tecamac, Edo de Méx.
- 5) Temoaya, Edo de Méx.
- 6) Dolores Hidalgo, Gto.
- 7) Apan, Hgo.
- 8) Chimilpa, Hgo.

En el CUADRO 1.1., se presentan la frecuencia y porcentaje de muestreos realizados en cada lugar. La zona con mayor número de muestreos fue Jilotepec, Edo. de Méx., dadas las facilidades para acudir a dicho lugar, así como el número de animales clínicamente enfermos de neumonía que se reportaron.

CUADRO 1.1 Distribución del total de muestras serológicas obtenidas en campo en las diferentes regiones.

REGIÓN	NÚMERO DE MUESTRAS	PORCENTAJE
JILOTEPEC, EDO. DE MÉX.	42	27
JALTENCO, EDO. DE MÉX.	9	6
FES-CUAUTITLAN, EDO. DE MÉX.	8	5
TECAMAC, EDO. DE MÉX.	40	26
TEMOAYA, EDO. DE MÉX.	22	14
DOLORES HIDALGO, GTO.	9	6
APAN, HIDALGO.	19	12
CHIMILPA, HIDALGO.	6	4
TOTAL	155	100

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el CUADRO 1.2., se presenta la distribución del total de muestreos con respecto a los grupos en los que se dividieron a los animales a nivel de campo, para su posterior análisis inmunológico.

CUADRO 1.2 Frecuencia y porcentaje de muestras obtenidas en campo de los diferentes grupos de animales.

ANIMALES MUESTREADOS	NÚMERO DE MUESTRAS	PORCENTAJE
ENFERMOS	96	64
CONVALECIENTES	34	21
SANOS	25	15
TOTAL	155	100

VII.3. PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA (LKT) DE *M. haemolytica* PARA LA PRUEBA VISUAL SIMPLE.

VII.3.1. Material Bacteriológico.

De las diferentes regiones muestreadas en campo, se obtuvieron 3 aislamientos de cepas de *M. haemolytica* de animales muertos por el proceso neumónico, a partir de muestras representativas de la zona de lesión pulmonar. Los serotipos capsulares de *M. haemolytica* fueron determinados por hemoaglutinación indirecta, utilizando antisueros de referencia y siguiendo la técnica sugerida por Frank en 1978 en microplacas de titulación de 96 pozos.¹⁵

TELON COM
FALLA DE ORIGEN

VII.3.2. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Se utilizó una cepa de *M. haemolytica* serotipo A2, obtenida de un animal muerto por neumonía muestreado en campo durante el desarrollo de la investigación, para la obtención de los antígenos a probar (LKT y PME). Se realizó el cultivo de las bacterias en cajas de agar sangre, por el método de estría cerrada, incubándose 24 horas a 37 C y posteriormente se realizó la tinción de Gram, así como las pruebas bioquímicas pertinentes para su identificación (CUADRO 1.3).^{12,113}

CUADRO 1.3 Pruebas Bioquímicas de identificación de *M. haemolytica*.^{12,113}

Oxidasa	+
TSI	+
Motilidad	-
Glucosa	+
Hemólisis	+
Crecimiento en Agar MacConkey	+a
Reducción de nitritos	+
Indol	-
Urea	-

a. Solo algunas cepas lo presentan y es limitado

VII.3.3. Producción de LKT.

Se cultivaron las mismas cepas obtenidas de lesiones neumónicas de *M. haemolytica* en agar sangre y se incubaron a temperatura de 37 C por 18 horas. Se cosecharon y cultivaron en matraces que contenían 250 ml de medio RPMI 1640 adicionado con 7% de suero fetal bovino. Se incubó en baño María a 37 C con movimiento constante, a una velocidad de 100 rpm, durante 5 a 6 horas. Se centrifugó a 1500 x g por 20 min., se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en un medio fresco (250ml de medio RPMI 1640 adicionada con 7% de suero fetal bovino) para una segunda incubación de una a dos horas a 37 C en baño María con movimiento constante.

TEL. 0212 5077
FALLA DE ORIGEN

Posteriormente se centrifugó para recuperar el sobrenadante del cual se obtuvieron alícuotas para determinar su efecto citotóxico. La cantidad de leucotoxina producida se determinó utilizando la técnica de ensayo visual simple.¹¹⁴

VII.3.4. Titulación de LKT de *M. haemolytica* .

Para la titulación de leucotoxina de *M. haemolytica* se requirieron leucocitos de sangre periférica de ovino, por lo que se procedió a su obtención:

VII.3.4.1. Obtención de leucocitos de sangre periférica.

Se tomaron muestras de sangre periférica de bovino 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 seg., provocando el choque hipotónico que produjo la lisis de los eritrocitos. Posteriormente se le agregó la misma cantidad de solución salina fisiológica (SSF) concentrada a 2X, con lo cual se detuvo la lisis eritrocítica. Los tubos se centrifugaron a 800 X g por 5 min, hasta obtener el paquete globular blanco, libre de eritrocitos. El paquete celular blanco se resuspendió en medio RPMI 1640 a una concentración de 1×10^6 células por ml.¹¹⁴

VII.3.4.2. Titulación de LKT.

En placas de microtitulación de 96 pozos fondo plano se agregaron 200 μ l de sobrenadante de cultivos concentrado de *M. haemolytica* a la primera fila. A partir de la fila "B" y hasta la fila "H" se adicionaron 100 μ l de sobrenadante para posteriormente realizar diluciones dobles, pasando 100 μ l de la fila "A" a la "B" y "B" la "C" y así sucesivamente hasta la fila "H". Se agregaron 100 μ l de leucocitos (1×10^7 cel/ml) en medio de RPMI 1640 a cada pozo, obtenidos por choque hipotónico y se incubó por una hora a 37 C. Posteriormente se centrifugó la placa a 800 X g durante 5 min y se decantó el sobrenadante, se adicionó formalina amortiguada al 10%, y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente se tiñeron las placas con una solución de cristal violeta al 1% durante 10 min, lavándose finalmente con agua corriente. Un fondo azul en los pozos, indicó la presencia de células teñidas y por lo tanto la ausencia de leucotoxina de *M. haemolytica* en el sobrenadante. Un fondo claro indicó en contra parte la presencia leucotoxina que ejerciendo su efecto de lisis sobre las células "blanco", eliminando el sustrato celular a teñir.¹¹⁴

VII.3.5. Determinación de anticuerpos contra la LKT de *M. haemolytica*.

Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tiene la leucotoxina de *M. 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 μ l de RPMI 1640 en microplacas de titulación de 96 pozos de fondo plano y 8 μ l 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 μ l de leucotoxina ya titulada (título 1:2), y se adicionaron 100 μ l de células (leucocitos) a todos los pozos. Se dejó incubar una hora a 37 C y se centrifugó a 800 X g durante 5 min., se decantó el sobrenadante y se agregó formalina al 10% para fijar las células, pasados 20 min. se agregó cristal violeta al 1% y después de 5 min., se realizó la lectura de los resultados previo lavado de las placas.

Un fondo claro indicó la ausencia de anticuerpos, por lo que la leucotoxina quedaba libre ejerciendo su efecto de lisis sobre las células "blanco" eliminando el sustrato a teñir. Un fondo de color azul indicaba la presencia de anticuerpos neutralizantes de leucotoxina en suero.

VII.4. TÉCNICA DE OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *M. haemolytica*.

Se sembraron las cepas de *M. haemolytica* por 12 hrs a 37 C en medio sólido (agar sangre). Posteriormente se resembraron en un litro de medio de cultivo líquido BHI, incubándolos a 37 C hasta una absorbancia de 0.9 A 600 nm. Se cosecharon las células por centrifugación a 4 C, a 3500 X g / 25min. Se lavaron las células obtenidas del centrifugado anterior, con HEPES (2 veces), por resuspensión y posteriormente se centrifugaron a 4 C, 3500 X g por 20 min. La pastilla se resuspendió en 60 ml de HEPES 10 mM y 1 mg de DNAsa pancreática y RNAsa pancreática, adicionando inhibidores de proteasas PMSF 0.1 M y EDTA de 1 a 3 mM.

Para obtener las fracciones celulares se sonicó la muestra distribuyendo las células en varios tubos en cantidades de 10 a 15 ml un baño de hielo y a cada muestra se le realizaron 10 pulsares de 10 seg X 1 min. de descanso, de tres tiempos cada uno con sonicador de punta. Se centrifugó la muestra sonicada a 1000 X g / 15 min para la remoción de los restos celulares. Posteriormente se

recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 150,000 X g / 2 hrs en HEPES. La pastilla obtenida se consideró correspondía a una fracción de la envoltura celular cruda que contiene membrana externa y membrana citoplasmática. La pastilla de membranas totales se disolvió en amortiguador y sarcosil al 1% (10 ml) y se puso en agitación suave por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente la muestra se centrifugó a 150,000 X g / 1 hr y el paquete resultante, proteínas de membrana externa, se disolvió en agua deionizada, mientras que el sobrenadante correspondió a la fracción de membranas internas.¹¹⁵

VII.4.1. Purificación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos.

En 400 µl de metanol se adicionaron 100 µl de la solución de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* y se sometió a la acción del vortex y posteriormente se centrifugó durante 10 s a 9,500 X g en microtubos cónicos de polietileno, para la colección total de la muestra, que correspondía a la fracción de membrana externa. Se adicionaron 100 µl de cloroformo a la muestra anterior, sometiéndola nuevamente a la acción del vortex y se centrifugó 10 s a 9000 X g. Para muestras con alto contenido de fosfolípidos, como la que se obtuvo a partir de *M. haemolytica*, se emplearon 200 µl de cloroformo. La separación de las fases se llevó a cabo adicionando 300 µl de agua destilada y sometiéndola suavemente a la acción del vortex, centrifugando finalmente 1 min a 9000 X g. La fase superior se removió cuidadosamente y se desechó. Por último se adicionaron 300 µl de metanol al resto de la fase clorofórmica inferior y la interfase con la proteínas precipitadas, que fueron mezcladas y centrifugadas 2 min a 9000 X g; el sobrenadante fue removido. El pellet de proteínas se secó bajo rocío de aire y se guardó hasta su uso.¹¹⁶

VII.4.2. Cuantificación de proteínas.

El contenido de proteínas totales fue determinado por colorimetría, utilizando el método de microtitulación de Bradford, utilizando un estándar de albúmina sérica bovina. Cada microtubo con la pastilla se solubilizó con 200 µl de amortiguador lisis. Se realizó una curva con la albúmina sérica bovina de 1 a 10 µg / ml, 10 µl de PBS y 190 µl de reactivo de Bradford, en placas de fondo plano para ELISA. Se colocaron 10µl de muestra de proteína de *M. haemolytica* más 190 µl de reactivo de Bradford, determinando la cantidad de proteína mediante la lectura de las placas en el lector de ELISA a 405 nm y por regresión lineal.¹¹⁷

VII.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (PAGE-SDS).

VII.5.1. Preparación de la muestra.

Para la separación analítica de las proteínas en función de sus pesos moleculares, se utilizó PAGE-SDS por el método de Laemmli.¹¹⁸ Se ajustó la concentración de proteínas necesario a utilizar en el corrimiento electroforético, la pastilla se disolvió en 50 μ l de amortiguador de muestra y se colocaron 10 μ l de la muestra en cada carril del gel de poliacrilamida.

VII.5.2. Corrimiento electroforético.

Para determinar que proteínas de la fracción de membrana externa de *M. haemolytica* eran reconocidas por los anticuerpos contenidos en los sueros de los animales problema, primero se procedió a separarlas en un corrimiento electroforético las fracciones de proteínas de membrana externa, interna y citoplasma. Una vez marcadas las diferencias entre estas tres fracciones, se procedió a correr nuevamente las proteínas de membrana externa en geles de poliacrilamida.

Los antígenos se solubilizaron mezclando 50 μ g de antígeno con 200 μ l de amortiguador de muestra (4 ml de agua destilada, 1 ml de Tris - HCl al 0.5 M y a un pH de 6.8, 0.8 ml de glicerol, 1.6 ml de sodio dodecilsulfato al 10%, 4 ml de 2 β -mercaptoetanol y 0.2 ml de Azul de bromofenol al 0.5%), sometiéndose a ebullición (95 C) durante 1 minuto. Posteriormente se adicionaron a cada carril 10 μ l de la muestra, haciéndola correr en PAGE-SDS al 12.5 %, por el método de Laemmli.¹¹⁸ formaron canales en el gel concentrador, mediante un peine y sobre estos canales se depositaron las muestras de los antígenos a probar, excepto en un canal en el cual se depositó una muestra de los marcadores de peso molecular. El corrimiento se realizó a un voltaje de 80 volts para el gel concentrador y 120 volts para el gel separador, en solución amortiguadora de corrida. De cada corrimiento se hicieron dos geles, uno para ser teñido con Azul de Coomassie y el otro para realizar la inmunoelectrotransferencia. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie durante 12 horas a temperatura ambiente en agitación, posteriormente se destiñeron sometiéndolos a una solución de lavado, hasta obtener la intensidad de bandas deseada y finalmente éstos se conservaron en ácido acético 10% o deshidratados. El peso molecular de las bandas fue estimado según su posición en el gel, comparándolo con un estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos, corrido en el mismo gel.¹¹⁹

El peso de las proteínas se calculó por interpolación al graficar el PM contra el Rf de las proteínas separadas por PAGE-SDS y en la intersección se obtuvo el e'' .

1) Cálculo del P.M de las bandas con base en marcadores de peso conocido.

R_f : Distancia recorrida de la muestra problema

Distancia recorrida por el fondo

VII.6. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOTT).

Después de separar las proteínas por PAGE-SDS, las bandas de las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia a 80 volts ó 400 mA durante una hora.¹¹⁸

La membrana de nitrocelulosa fue tratada por 24 hrs. con leche descremada al 5% con la finalidad de bloquear puntos de unión no específicos para los anticuerpos. A continuación, se retiró la leche descremada, se lavó la membrana en tres ocasiones con PBS-Tween 20 al 0.05% por 15 minutos y se procedió a cortar la membrana en tiras de papel de aproximadamente 0.5 cm. de ancho, las cuales fueron depositadas en tubos de ensaye con tapón, a los que se les adicionaron 7 ml de suero de las diferentes muestras, con 2 ml de PBS-Tween 20 y leche descremada al 5% y se incubaron en agitación durante dos horas a 37 C, o toda la noche a 4 C. A continuación la membrana se lavó por tres ocasiones con PBS-Tween 20 durante 15min. cada uno y finalmente se incubaron las tiras de papel de nitrocelulosa con Proteína A conjugada con peroxidasa, a una dilución de 1:2000 en agitación por dos horas, a 37 C, o toda la noche a 4 C. Nuevamente se hicieron los tres lavados de 15 min. cada uno con PBS-Tween 20 y finalmente dos más con PBS de 10 min cada uno. Para el revelado de la membrana se utilizó 3'3 diaminobencidina (DAB) al 0.05% (20mg de DAB) en ácido fosfórico 50mM a pH 7.4, la cual se agitó por 40 min. y se filtró. A esta solución se agregó lentamente 1.2 ml de solución NiCo (15mg de NiCl₂ y 15 mg de CoCl₂) y 1 ml de H₂O₂ al 0.1%. Una vez que se prepararon estas soluciones se le agregaron a la membrana en agitación y la reacción se paró hasta obtener la intensidad deseada de las bandas con agua corriente.¹²⁰

VII. II FASE DE DESAFÍO EXPERIMENTAL.

VII.7 Muestreo Serológico de animales desafiados.

Se muestreo un rebaño del municipio de San Juan Jaltenco Edo. de Méx., el cual estaba clínicamente libre de cuadros neumónicos, por lo que se procedió a monitorearlos serológicamente, realizándoles pruebas de inmunoelectrotransferencia a partir de los sueros obtenidos contra proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*, seleccionando de ésta manera, a 8 corderos negativos al reconocimiento de dichas proteínas. Posteriormente, éstos fueron llevados a las instalaciones del CENID-Microbiología, INIFAP-SAGARPA, en Cuajimalpa, Méx., D.F., para su posterior desafío experimental. Se obtuvo un total de 56 sueros de los muestreos realizados a partir del grupo experimental. Los corderos tenían de 3 a 4 meses de edad y un peso promedio de 25 Kg.

VII.8. DESAFIO VIRAL.

Los 8 corderos se dividieron en dos grupos. El grupo desafiado incluyó los animales aretados con el número, 30, 31, 32, 33 y 38 y el grupo testigo a los animales con número 34, 35 y 41.

A partir de la fecha que llegaron los animales, a las instalaciones del CENID- Microbiología, se comenzó a realizar un monitoreo, de temperatura antes, durante y después del desafío, así como un muestreo de sangre cada tercer día (CUADRO 2.1). Los animales no permanecieron en etapa de adaptación, iniciando los respectivos muestreos al primer día de su llegada a dichas instalaciones.

Los corderos se desafiaron el día 2 del experimento con virus vivo de Parainfluenza tipo 3, aislado de un bovino muerto de neumonía en Iowa, Estados Unidos. El virus se conservó y replicó en cultivo de células de cornetes nasales con medio MEM (Medio mínimo esencial) a 37 C. El inóculo viral demostró 64 unidades hemoaglutinantes en pruebas de hemoaglutinación directa, realizadas previamente en el laboratorio de microbiología del Departamento de Producción Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, de la UNAM.

Se utilizaron 2ml de la solución que contenía al virus, el cual se inoculó a los 5 animales por vía endotraqueal, desinfectando con alcohol previamente la zona a punccionar, que se localizó entre los anillos traqueales del 2º tercio de la misma. Los 3 animales, del grupo testigo, se inocularon con

2 ml de SSF por la misma vía. Posteriormente al grupo desafiado se le administraron 2ml (3mg/ml) de dexametasona por vía intramuscular del 3° al 6° día.

VII.9. DESAFÍO BACTERIANO.

Al día 7 del calendario (CUADRO 2.1), se completó el desafío con una cepa viva de *M. haemolytica* serotipo A2, recuperada de un animal muerto en un proceso neumónico en campo, con la cual se realizaron otros ensayos que comprobaron su patogenicidad. Las colonias bacterianas se recolectaron en condiciones estériles directamente de las cajas de cultivo de agar sangre y posteriormente se diluyeron en solución salina fisiológica en tubos de ensaye para estandarizarlos con un espectofotómetro a 560 nm, con densidad óptica de 0.45, obteniendo una concentración de 1×10^9 U.F.C. / ml. Se administraron 2ml a cada animal del grupo de desafío y 2ml de S.S.F. a los animales del grupo testigo, en la misma forma en que se administró el virus PI3 5 días antes. Simultáneamente se continuó con la administración de dexametasona a dosis de 2ml (6mg) por vía intramuscular hasta el día 12 °.

VII.10. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Finalmente el día 16° se sacrificaron los animales tanto del grupo de desafío como del grupo testigo, para evaluar la presencia de lesiones neumónicas y obtener muestras de pulmón representativas de las mismas de aproximadamente 0.5 cm^3 , que abarcaban zonas de lesión y zonas de tejido sano, las cuales se fijaron en formalina amortiguada al 10% para su posterior análisis histopatológico.

A partir de esta fase y con el aislamiento de la cepa de *M. haemolytica* inoculada, a partir de las lesiones neumónicas, se procedió a realizar la misma metodología, ya descrita para el muestreo de campo, con los sueros de los animales experimentales (7 muestreos), CUADRO 2.1.

CUADRO 2.1. Calendarización del desafío viral y bacteriano, así como del muestreo de sangre de los animales desafiados experimentalmente.

DÍA	DESAFIO	SANGRADO
1		SANGRADO
2	D. VIRAL (PI3)	SANGRADO
3	Dexametasona (1ml)	
4	Dexametasona (1ml)	
5	Dexametasona (1ml)	SANGRADO
6	Dexametasona (1ml)	
7	D. BACTERIANO	SANGRADO
8	Dexametasona (2ml)	
9	Dexametasona (2ml)	
10	Dexametasona (2ml)	
11		
12	Dexametasona (2ml)	SANGRADO
13		
14		SANGRADO
15		
16		SANGRADO
SACRIFICIO		

D: Desafío

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 155 sueros entre los que se encontraron animales de 1º muestreo, que eran básicamente animales con cuadro clínico de neumonía (ENFERMOS) y animales de 2º muestreo que correspondían a los animales enfermos que no murieron del proceso neumónico (CONVALECIENTES). También se realizó el muestreo de animales clínicamente sanos. De los animales desafiados experimentalmente (8) se obtuvieron un total de 56 sueros, de acuerdo al número de muestreos (7) según lo marca el calendario de desafío. Obteniendo un total de 211 sueros, los cuales se conservaron en congelación hasta su uso para el desarrollo de las diferentes pruebas.

1) ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE A LA LEUCOTOXINA.

Se obtuvieron los títulos promedio de los anticuerpos antileucotoxina mediante el cálculo del logaritmo natural del título promedio y se procedió a graficar los datos de los animales muestreados en campo. Como se muestra en la FIGURA 1, los títulos más altos correspondieron a los animales convalecientes (4); éstos descendieron en los animales enfermos (2) y se observó una respuesta relativamente alta en los animales clínicamente sanos (3).

FIGURA 1

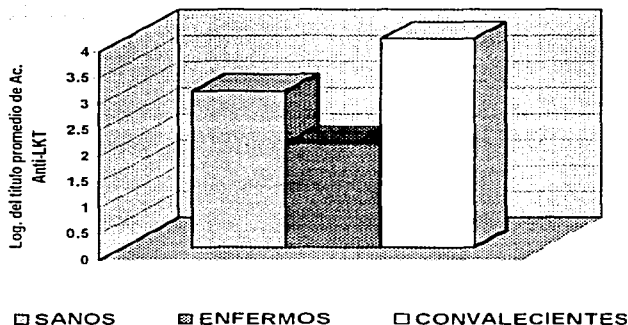


FIGURA 1. TÍTULO PROMEDIO DE ANTICUERPOS ANTI-LEUCOTOXINA DE ANIMALES MUESTREADOS EN CAMPO.

Posteriormente se procedió a obtener las respectivas varianzas del título promedio de anticuerpos-anti-LKT, obteniendo una respuesta altamente significativa para el título de anticuerpos del grupo de animales convalecientes ($p \leq 0.01$) con respecto al grupo de animales enfermos y sanos. En tanto que la respuesta inmune entre el grupo de animales enfermos y sanos no tuvo diferencia significativa.

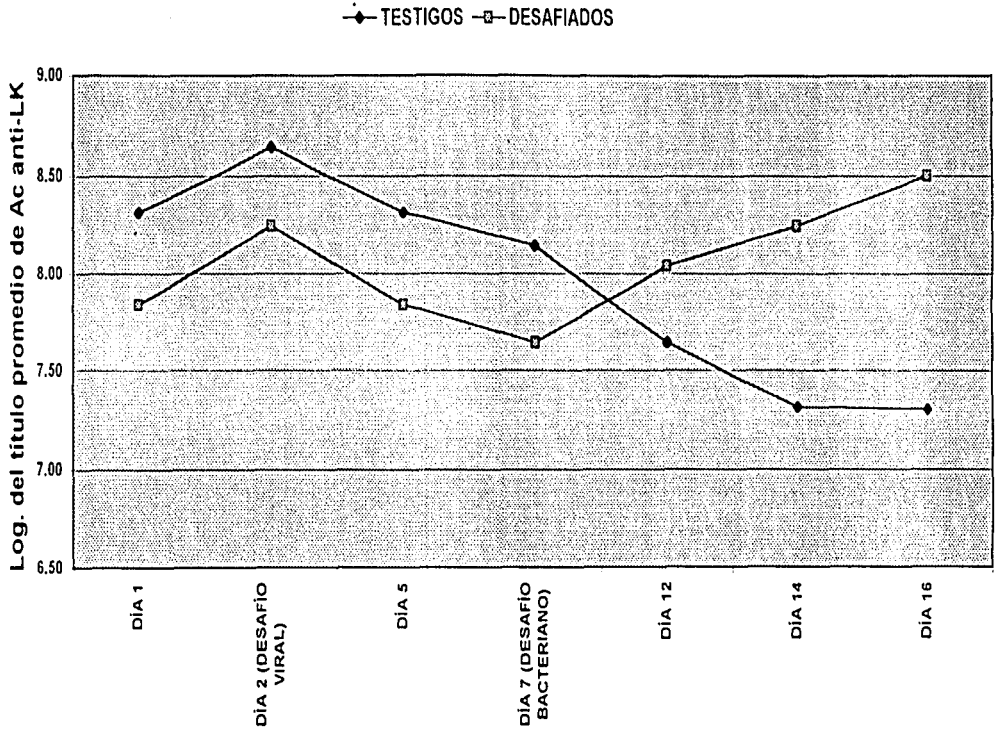
En los animales experimentales, tanto del grupo testigo como del grupo desafiado, se realizaron 7 muestreos serológicos para determinar la presencia de anticuerpos antileucotoxina. La respuesta inmune en los animales del grupo testigo varió desde el primer muestreo, ya que los títulos de anticuerpos se encontraban elevados (8.31); como en el grupo desafiado (7.84), pese a que resultaron negativos en su lugar de origen. Para el segundo muestreo, éstos se elevaron aún más (8.64). Sin embargo, posterior al segundo muestreo, los títulos descendieron notablemente, la respuesta inmune varió ya que para el día 16, fecha del último muestreo, los títulos se estabilizaron en 7.3, como lo muestra la FIGURA 2.

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

El grupo desafiado presentó un patrón inmunológico de anticuerpos antileucotoxina muy variable a diferencia de los animales muestreados en campo y del mismo grupo testigo, ya que estos presentaron un título promedio de 7.84 al día 1 del calendario del desafío y como se puede observar en la FIGURA 2 éste se encuentra por debajo del título promedio que alcanzaron los animales del grupo testigo (8.31) al mismo día del desafío experimental. Posteriormente en el segundo muestreo (día 3) que correspondió al desafío viral, los animales del grupo desafiado elevaron su respuesta (8.24) casi al mismo nivel que alcanzaron los del grupo testigo (8.64), para el día 5 posdesafío viral, el título descendió a 7.84 presentando el mismo título en el que comenzaron estos animales en el primer muestreo (7.84). Para el día 7, que correspondió al desafío bacteriano, los títulos descendieron aún más (7.64). Sin embargo para el día 12 posdesafío bacteriano los títulos se elevaron (8.06) y lo continuaron haciendo hasta el último muestreo que correspondió al día 16 posdesafío bacteriano alcanzando títulos promedio de 8.5.

Finalmente se procedió a obtener las respectivas varianzas del título promedio de anticuerpos-anti-LKT, del grupo testigo, donde se observó que no existe diferencia significativa entre los diferentes muestreos de acuerdo al calendario de inoculación, excepto en el en el segundo (día 3, desafío viral) y quinto muestreo (día 12 posdesafío bacteriano), los cuales presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al resto de los muestreos. Mientras que en el grupo desafiado, solo hubo diferencia altamente significativa ($p \leq 0.01$) en el muestreo del día 7, fecha del desafío bacteriano.

FIGURA 2



TÍTULO PROMEDIO DE ANTICUERPOS ANTILEUCOTOXINA DE ANIMALES DESAFIADOS
EXPERIMENTALMENTE .

FALLA DE ORIGEN
TESTES NOV

2) ANÁLISIS de PAGE- SDS.

Los perfiles de proteínas, en geles de poliacrilamida al 12.5 %, teñidos con Azul de Coomassie a partir de aislamientos de *M. haemolytica* serotipo A2, consistieron en obtener las tres diferentes fracciones celulares: proteínas de membrana externa, proteínas de membrana interna, así como proteínas citoplasmáticas (FIGURA 3) para posteriormente establecerse diferencias en cuanto al patrón proteínico de las diferentes fracciones. Los perfiles de proteínas de las tres fracciones presentan cierta similitud más no son idénticos, ya que como se observa en el gel, existen proteínas que comparten las tres fracciones. Las proteínas que evidencian mayor diferencia se encuentran marcadas con flechas sobre el gel.

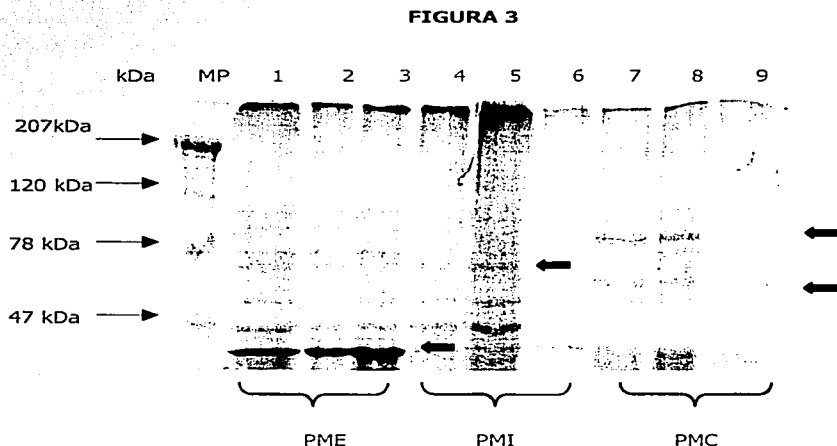


FIG. 3 Electroforesis de las tres fracciones celulares de *M. haemolytica*. PAGE-SDS al 12.5% teñidos con Azul de Coomassie. Marcadores de Peso Molecular (MP), Carril 1, 2 y 3: Proteínas de membrana externa (PME), Carril 4, 5 y 6: Proteínas de membrana interna (PMI), Carril 7, 8 y 9: Proteínas de membranas citoplasmáticas (PMC).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una vez establecidas las diferencias en las tres fracciones de proteína de *M. haemolytica* serotipo A2, se procedió a realizar geles de poliacrilamida al 12.5%, teñidos con Azul de Coomassie, en donde se determinó el patrón de proteínas de la fracción de membrana externa como se muestra en la FIGURA 4. En la siguiente electroforesis, se detectó una gran cantidad de bandas de proteínas de variables pesos moleculares, este mismo patrón proteínico se observó en los consecutivos corrimientos electroforéticos.

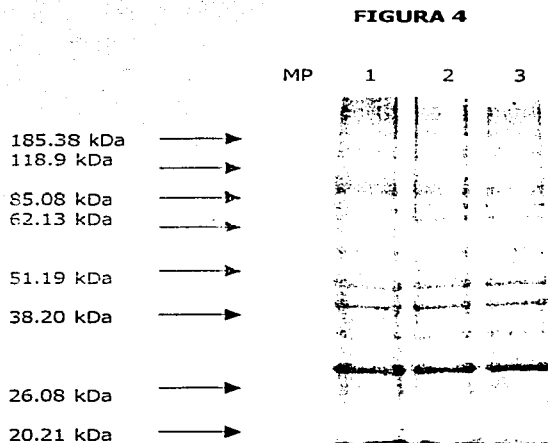


FIG. 4 Electroforesis de la fracción de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*. PAGE-SDS al 12.5% teñidos con Azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (MP); carril 1, 2 y 3 : proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*.

TESIS
FALLA DE ORIGEN

De los diferentes aislamientos de *M. haemolytica* se obtuvieron fracciones de membrana externa que se corrieron en geles de poliacrilamida PAGE-SDS al 12.5 %, obteniendo corrimientos electroforéticos homogéneos con respecto al patrón de proteínas obtenidos en las extracciones anteriores según se observa en la FIGURA 5.

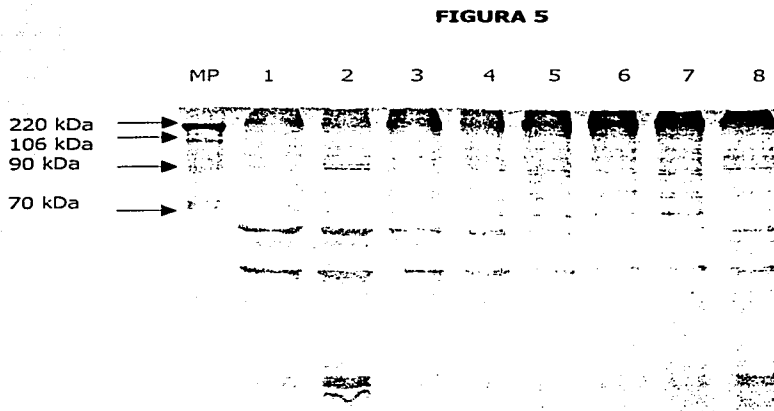


FIG. 5 Electroforesis de la fracción de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*. PAGE-SDS al 12.5 %. Marcadores de peso molecular (MP), carril 1 al 8, proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3) ANÁLISIS DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Se seleccionaron 8 proteínas sobre PAGE-SDS al 12.5% de variables pesos moleculares de acuerdo a su alto porcentaje de reconocimiento en las inmunolectrotransferencias por los sueros de los animales muestreados tanto en campo como en la fase experimental, las cuales se muestran con flechas en la FIGURA 5 de la pagina 44. Para la evaluación de este reconocimiento proteínico se tomaron en cuenta variables que pudiera influir en el reconocimiento de las mismas tales como: Región, Muestreo, Grupo y Temperatura.

3.1) Análisis de inmunolectrotransferencia por Región (campo).

En las inmunolectrotransferencias que se realizaron con las de fracciones de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* enfrentándolas con los sueros de los animales muestreados en campo, en la región de Chimilpa y Apan Hgo. Un suero (carril 7) reconoció a las 8 proteínas seleccionadas en la inmunolectrotransferencia y adicionalmente reaccionó con dos proteínas más, no reconocidas por los demás sueros, dichas proteínas se muestran con flechas. Sin embargo, todos los sueros de estas regiones, reconocieron a la proteína 1 (94 kDa), 5 (53 kDa) y 8 (27 kDa), excepto un suero (carril 1) que correspondió a una animal enfermo (E) y que solo reconoció a la proteína 8. En la FIGURA 6 se presentan las respuestas con sueros de animales enfermos (E) y convalecientes (C) intercalados de manera que se pueden apreciar las diferencias en cuanto al patrón de reconocimiento proteínico de los dos diferentes grupos de animales. Se muestran como patrón de reconocimiento a las proteínas 1, 3, 5, 6, 7 y 8, así como sus respectivos pesos moleculares observándose el reconocimiento de la mayoría de los sueros a una gran cantidad de proteínas, que corresponden a las bandas que se marcan con flechas entre la proteína 3 de 68 kDa y la proteína 5 de 53 kDa.

FIGURA 6

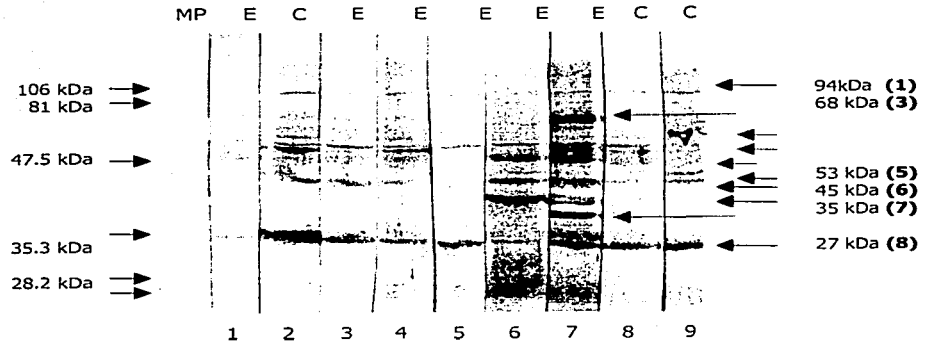


FIG. 6 Inmunoelctrotransferencia del suero de animales muestreados en Chililpa y Apan Hgo. Marcadores de peso molecular (MP)., carril 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 animales enfermos (E)., carril 2, 8 y 9 animales Convalecientes (C).

TESIS DE
FALLA DE ORIGEN

En los muestreos serológicos realizados en Jilotepec en animales enfermos, se observó cierta homogeneidad con respecto al patrón de reconocimiento de las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*. Como se muestra en la siguiente inmunoelectrotransferencia de la FIGURA 7, dicho patrón incluye a las proteínas 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Se muestra con flechas sobre la membrana, las proteínas reconocidas con sus respectivos pesos moleculares por el suero de los animales enfermos mostrando un patrón muy homogéneo de reconocimiento hacia dichas proteínas.

FIGURA 7

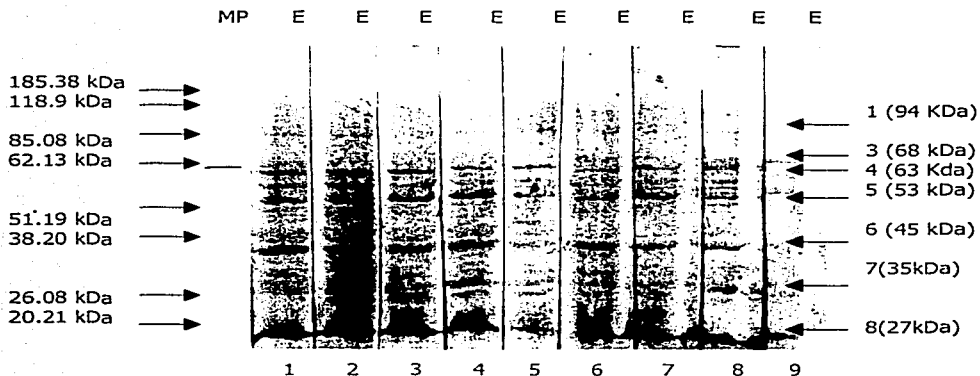


FIG. 7 Inmunoelectrotransferencia del suero de animales muestreados en Jilotepec, Edo. de Méx. Marcadores de peso molecular (MP), carril 1 a 9 animales enfermos (E).

TEXAS FOR
FALLA DE ORIGEN

3.2) Análisis de inmunoelectrotransferencia por Región (experimentales).

Con respecto a las inmunoelectrotransferencia de los animales desafiados experimentalmente, se pudo apreciar un patrón cambiante de proteínas reconocidas por los sueros en diferentes tiempos posdesafío, desde el primer muestreo hasta el último. A pesar de que los animales a desafiar se evaluaron serológicamente contra las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* en su lugar de origen (Jaltenco, Edo.de Mex.), antes de ser llevados a las instalaciones en donde se les desafió resultando negativos. Se observó que en el primer muestreo de sangre según el calendario del CUADRO 2.1., la inmunoelectrotransferencia demostró un fuerte reconocimiento a las proteínas seleccionadas de *M. haemolytica* (FIGURA 8). Sin embargo, los sueros de estos animales también reconocieron una gran cantidad de proteínas adicionales marcadas con flechas sobre la membrana, que no aparecen en las inmunoelectrotransferencias de los animales muestreados en campo. Los sueros de este grupo reconocieron con mayor intensidad 6 de las 8 proteínas, seleccionadas en los casos de campo.

FIGURA 8

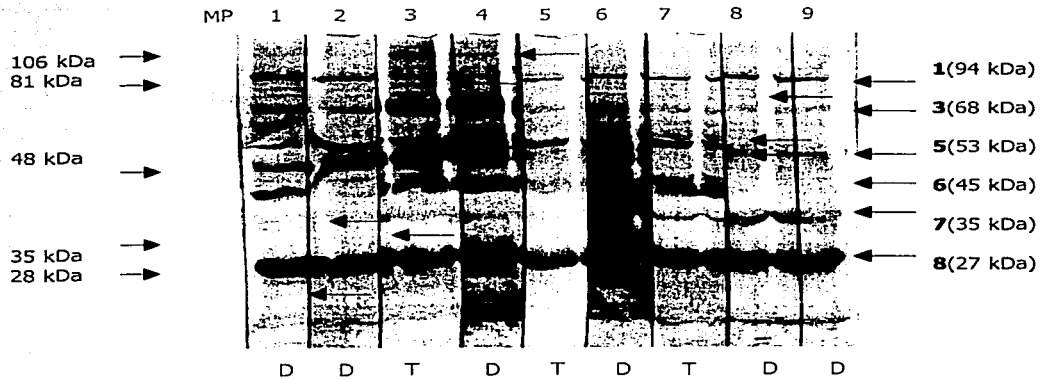


FIG. 8 Inmunolectrotransferencia del 1^{er} muestreo de los animales desafiados experimentalmente. Según el calendario de inoculación (CUADRO 2.1) de los corderos en desafío experimental. Marcadores de peso molecular (MP)., carril 3, 5 y 7 animales testigo (T)., carril 1, 2, 4, 6, 8 y 9 animales desafiados (D).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al 4º muestreo, después del desafío viral, se realizó otra inmunoelectrotransferencia (FIGURA 9), en donde se apreció claramente, una gran reconocimiento por las 8 proteínas seleccionadas en campo. Este muestreo coincidió con la fecha del desafío bacteriano y es hasta este momento, cuando los animales entraron en contacto con la bacteria viva al ser inoculada por vía endotraqueal. Sin embargo, se siguió observando el reconocimiento de una serie de proteínas adicionales que se salen de las establecidas previamente e identificadas por los sueros de los animales muestreados en campo que como se muestra en el gel (FIGURA 4), son las 8 preestablecidas en el patrón de reconocimiento para los sueros de dichos animales. Como se puede apreciar en la inmunoelectrotransferencia, los sueros de los animales tanto del grupo testigo (T), como de grupo desafiado (D), permanecieron reconociendo las 8 proteínas establecidas y además se apreciaron otras bandas de proteínas que fueron reconocidas por estos animales. Se muestran con flechas sobre la inmunoelectrotransferencia, muchas de las proteínas adicionales reconocidas por los sueros de los animales desafiados.

FIGURA 9

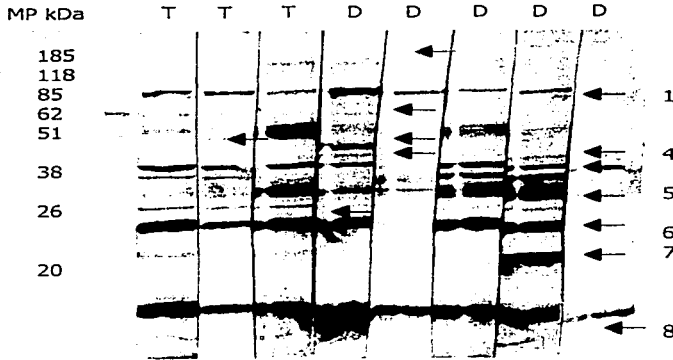


FIGURA 4

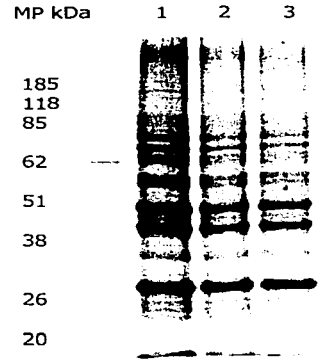


FIG. 9 Inmunoelctrotransferencia del 4º muestreo de los animales desafiados experimentalmente. Según el calendario de inoculación(CUADRO 2.1). Marcadores de peso molecular(MP)., carril 1, 2 y 3 animales testigo (T)., carril 4....8 animales desafiados (D). **FIG. 4** PAGE-SDS al 12.5% teñido con Azul de Coomassie. Marcadores de peso molecular (MP)., carril 1, 2 y 3 PME de *M. haemolytica*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A partir del mayor reconocimiento con los sueros de los animales muestreados tanto en campo como experimentalmente sobre las electrotransferencia; se muestran sobre el PAGE-SDS al 12.5% las 8 proteínas seleccionadas para su posterior evaluación en el presente trabajo. En el siguiente corrimiento electroforético (FIGURA 5) de los diferentes aislamientos de *M. haemolytica* se muestran con flechas dichas proteínas con sus respectivos pesos moleculares.

FIGURA 5

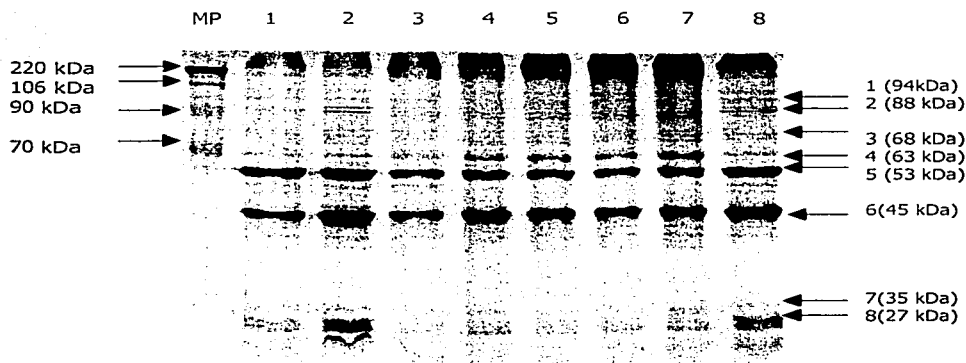


FIG. 5 Electroforesis de la fracción de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*. PAGE- SDS al 12.5 %. Marcadores de peso molecular (MP)., carril 1 al 8, proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*.

TEMA
FALLA DE ORIGEN

4) ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE MUESTRAS OBTENIDAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL.

Al finalizar el periodo de desafío, se realizó la eutanasia a los corderos tanto del grupo testigo como del grupo desafiado, para posteriormente realizarles la necropsia y poder definir el daño al pulmón.

Lesiones macroscópicas:

Los pulmones de los 3 animales del grupo testigo no presentaron cambios patológicos aparentes. Mientras que los 5 animales del grupo experimental presentaron pulmones que en algunas zonas no colapsaron, así como zonas multifocales de coloración grisáscea. Se observaron también en los lóbulos anteriores zonas multifocales de color rojizo que sugerían congestión. Las lesiones observadas fueron sugestivas de neumonía intersticial; sin embargo, sólo uno de los animales presentó una zona de consolidación roja en el lóbulo anterior derecho, sobre la cual se encontró abundante material de aspecto fibrilar, de color amarillo, el cual se extendía hacia el saco pericárdico, además de formar adherencias del pulmón hacia la pleura y los lóbulos pulmonares adyacentes. Sólo este individuo desarrolló lesiones de hidrotórax e hidropericardio, además del cuadro de pleurobronconeumonía fibrinosa característico de la pasteurelosis.

Lesiones microscópicas:

Microscópicamente los pulmones de los 3 animales del grupo testigo, desarrollaron grados variables de neumonía intersticial que fluctuó de leve a moderada, predominando en el cuadro de lesión la hiperplasia del tejido linfóide asociado a bronquiolos. Es importante señalar que a estos animales solo se les administró solución salina fisiológica por vía endotraqueal, tanto en el desafío viral como en el desafío bacteriano.

Los pulmones de los animales desafiados desarrollaron en su mayoría (4:5) neumonías de tipo intersticial difusa que fluctuó de moderada a severa, en la cual se podía observar el engrosamiento del epitelio alveolar por hiperplasia de neumocitos II y ligero infiltrado mononuclear, así como también era evidente la hiperplasia del tejido linfóide asociado a bronquiolos. Solo un animal desarrolló una bronconeumonía fibrinopurulenta aguda que microscópicamente se distribuía de forma difusa severa. Los principales cambios observados fueron vasculares e incluían

hemorragia, congestión y edema, así como la presencia de fibrina depositada principalmente entre los septos interalveolares engrosándolos y haciéndolos más evidentes, la pleura se encontraba igualmente engrosada.

El tejido alveolar se encontró ocupado principalmente por un infiltrado inflamatorio de leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y en menor cantidad leucocitos mononucleares, macrófagos alveolares, los cuales se observaron en la luz de alveolos y de algunos bronquios y bronquiolos. En otros campos era evidente la necrosis licuefactiva del parénquima pulmonar, además de presentarse "células en avena" distribuidas multifocalmente.

5) ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizó el análisis estadístico, con base a frecuencia y porcentaje de los diferentes, eventos durante el desarrollo de la investigación, estableciendo la distribución de los mismos, así como frecuencia y porcentaje. Para dicho efecto se vaciaron los datos obtenidos a un programa estadístico (Stata.7) elaborado para los departamentos de epidemiología de la SAGARPA.

Posteriormente se realizó un segundo análisis estadístico denominado Sistema de Análisis Estadístico: Statistical Análisis System (SAS) de la Universidad de Carolina del Norte, utilizando un procedimiento logístico (proc logistic) no paramétrico, en donde se evaluó la respuesta de las 8 diferentes proteínas contra las variables de región, muestreo, grupo y temperatura, determinándose mediante la respuesta de "sí", cuando se reconoció la proteína otorgándole la calificación de 1 (uno) y cuando no se reconoció la proteína se le otorgó la calificación de 0 (cero). (CUADRO 2.2)

CUADRO 2.2 Análisis de Máxima Verosimilitud de la respuesta a las 8 proteínas, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6	Pt7	Pt8
Región	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	**
Muestreo	**	**	NS	NS	NS	*	**	**
Temperatura	*	**	NS	**	NS	**	**	**
Grupo	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	**

* : Significativa ($p \leq 0.05$)

** : Altamente significativa ($p \leq 0.01$)

NS : No Significativa

5.2) Análisis de frecuencia y porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas por los sueros obtenidos en las diferentes regiones y de los animales desafiados experimentalmente.

En el CUADRO 3.1 se muestran frecuencia y porcentaje del total de muestras obtenidas en cada una de las regiones. A pesar de que cada región presenta características medio ambientales propias, se pudo observar en todas, una mayor capacidad de los sueros para reconocer a la proteína 5 (53kDa) y 6 (45kDa). Sin embargo, hubo regiones que reconocieron adicionalmente, proteínas de bajo peso molecular como en Temoaya, Apan, Jaltenco y Chimilpa donde los sueros reconocieron a las proteínas 1 (94kDa), 3 (68kDa), 7 (35kDa) y 8 (27kDa) en forma relevante.

Para el desafío experimental se observó que el mayor porcentaje de reconocimiento ocurrió al utilizar los sueros de los animales desafiados experimentalmente, para las proteínas 6 (45kDa) y 8 (27kDa) con un 86% y 84% respectivamente. El resto de las proteínas muestran a su vez un elevado porcentaje de reconocimiento en comparación al de los sueros obtenidos a nivel de campo.

Se aprecia a su vez, la distribución en cuanto a frecuencia y porcentaje, del total de muestreos (211) tanto a nivel de campo (155), como a nivel experimental (56). Como se puede apreciar, el mayor reconocimiento lo obtuvieron la proteína 5 de 53kDa con un 62.09 %; la proteína 6 de 45 kDa con un 67.77% y la 8 de 27 Kda con 54.98%.

CUADRO 3.1 Frecuencia y Porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas por los sueros obtenidos en las diferentes regiones y de los animales desafiados experimentalmente.

REGIÓN	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6	Pt7	Pt8
JILOTEPEC (n=42)	13(31%)	15(36%)	11(31%)	14(33%)	28(67%)	30(71%)	4(10%)	11(26%)
JALTENCO (n=8)	3(38%)	3(38%)	5(63%)	3(38%)	4(50%)	2(25%)	0(0%)	4(50%)
Cuautitlán (n=8)	4(50%)	1(13%)	2(25%)	1(13%)	4(50%)	7(88%)	1(13%)	0(0%)
TECAMAC (n=40)	0(0%)	1(3%)	15(38%)	9(23%)	21(53%)	22(55%)	1(3%)	16(40%)
TEMOAYA (n=18)	5(28%)	1(6%)	5(28%)	4(22%)	16(89%)	9(50%)	9(50%)	10(56%)
DOLORES HGO. (n=9)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	2(22%)	2(22%)	0(0%)	0(0%)
APAN HGO. (n=16)	3(19%)	1(6%)	3(19%)	2(13%)	10(63%)	10(63%)	2(13%)	15(94%)
CHIMILPA (n=6)	6(100%)	1(17%)	4(67%)	5(83%)	4(67%)	5(83%)	1(17%)	5(83%)
DESAFIO EXP.(n=56)	23(41%)	22(39%)	30(54%)	34(61%)	42(75%)	48(86%)	31(56%)	47(84%)
TOTAL (n=211)	57(27.01%)	45(21.33%)	75(35.55%)	72(34.12%)	131(62.09%)	143(67.77%)	57(27.01%)	116(54.98%)

INSTITUTO VETERINARIO
 ZOOTECNIA Y SANIDAD ANIMAL
 UNAM

5.4) Análisis de frecuencia y porcentaje del reconocimiento antigénico a las 8 proteínas por Grupo de animales muestreados en campo.

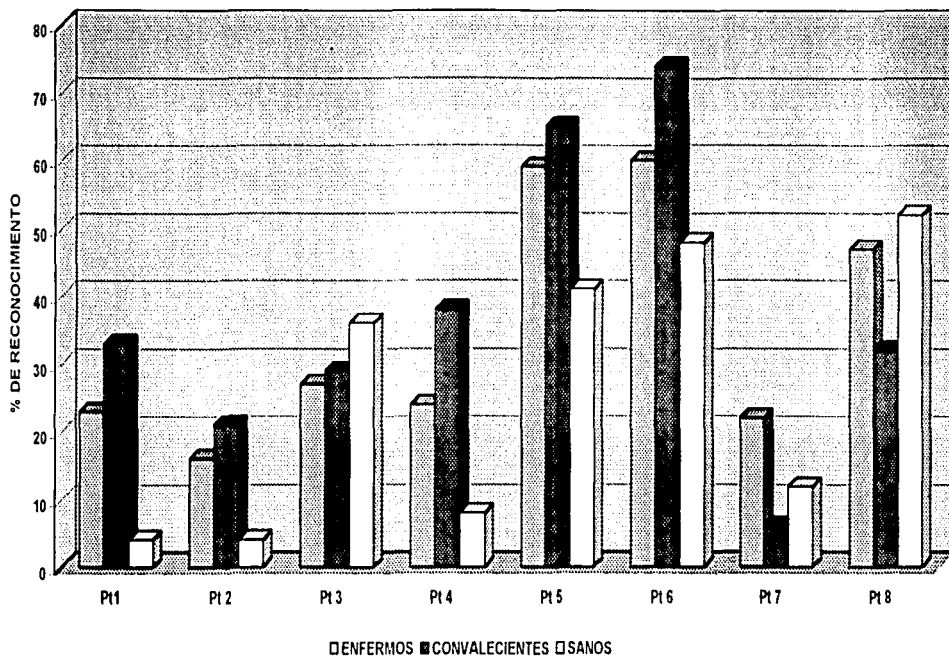
Del grupo de animales muestreados en campo, se obtuvieron la frecuencia y porcentaje de reconocimiento a las 8 proteínas según la condición de sanos, enfermos y convalecientes . En el CUADRO 3.2, se refieren estos resultados. Los animales enfermos como los convalecientes , reconocen en mayor porcentaje a las proteínas 5 y 6 mientras que los animales clínicamente sanos, reconocieron en mayor porcentaje a las proteínas 6 y 8 en niveles menores.

CUADRO 3.2 Frecuencia y porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas por Grupo de animales muestreados en campo.

GRUPO	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6	Pt7	Pt8
ENFERMOS (n=96)	22(23%)	15(16%)	26(27%)	23(24%)	57(59%)	58(60%)	21(22%)	45(47%)
CONVALECIENTES (n=34)	11(33%)	7(21%)	10(29%)	13(38%)	22(65%)	25(74%)	2(6%)	11(32%)
SANOS (n=25)	1(4%)	1(4%)	9(36%)	2(8%)	10(41%)	12(48%)	3(12%)	13(52%)

TR. 1000
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 10



ESTADÍSTICA
FALLA DE CATEGORÍA

PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO DE LAS 8 PROTEÍNAS EN ESTUDIO DE LOS ANIMALES MUESTREADOS EN CAMPO.

Pt = PROTEINA

5.5) Análisis de frecuencia y porcentaje del reconocimiento antigénico a las 8 proteínas por Grupo de animales muestreados en el desafío experimental.

De los animales desafiados se obtuvieron 7 muestreos, tanto del grupo testigo (21) como de los animales del grupo desafiado (35). En el CUADRO 3.3, se muestra la frecuencia y el porcentaje de reconocimiento a las 8 proteínas con la fecha de muestreo, así como con los eventos del desafío viral y del desafío bacteriano, los cuales corresponden al día 2 y 7 respectivamente. Como se puede observar, los sueros de los animales del grupo testigo reconocieron principalmente a la proteína 6 con un 86% y en segundo lugar a la proteína 8 con un 81%. Cabe mencionar que a estos animales, solo se les administró SSF durante el desafío. Se muestra la variación de porcentajes de reconocimiento que tuvieron los animales del grupo problema de acuerdo al calendario de inmunización.

Llama la atención, la elevada respuesta por las 8 proteínas al día 1 del calendario, ya que se supone, los animales no habían entrado aún en contacto con la bacteria. Para el día 3 posdesafío viral disminuyó drásticamente el reconocimiento por dichas proteínas y para el día 7, fecha del desafío bacteriano, la respuesta se exacerbó nuevamente a las 8 proteínas. Finalmente, para el día 9, fecha del último muestreo posdesafío bacteriano, la respuesta fue nula para las primeras 2 proteínas y comenzó a elevarse para las últimas 4 denotando mayor reconocimiento para la proteína 6 y 8 con un 100% y en menor porcentaje, las proteínas 5 y 7 con un 80%.

En el CUADRO 3.3 se anexó además el evento de temperatura, que permite evaluar cual pudo haber sido el efecto de ésta sobre el reconocimiento de las 8 proteínas según la fecha del calendario de inmunización. Coincide de forma relevante, la fecha de mayor reconocimiento proteínico con la fecha en que los animales demostraron elevación de temperatura (fiebre).

CUADRO 3.3 Frecuencia y porcentaje de reconocimiento de las 8 proteínas del grupo de animales muestreados en condiciones experimentales y que presentan Fiebre.

MUESTREOS	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7	PT8
1) TESTIGOS 1 *M	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%
1) DESAFIO 1*M	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%
Día 1								
1) FIEBRE 1 *M	2:5 40%	2:5 10%	2:5 40%	2:5 40%	2:5 40%	2:5 40%	2:5 40%	3:5 60%
2) TESTIGOS 2 *M	2:3 48%	0 0%	2:3 48%	2:3 52%	2:3 67%	3:3 100%	3:3 100%	17:7 81%
2) DESAFIO 2*M	1:5 20%	0 0%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%
Día 2 Desafío Viral								
2) FIEBRE 2 *M	0:5 0%	0:5 0%	2:5 40%	2:5 40%	2:5 40%	2:5 40%	2:5 40%	2:5 40%
3) TESTIGOS 3*M	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	3:3 100%	3:3 100%
3) DESAFIO 3*M	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	5:5 100%	5:5 100%
Día 3 postdesafío Viral								
3) FIEBRE 3 *M	2:5 40%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 %	2:5 40%	2:5 40%
4) TESTIGOS 4 *M	2:3 18%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	2:3 100%	3:3 100%
4) DESAFIO 4*M	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	5:5 100%	1:5 20%	5:5 100%
Día 7 D. Bacteriano								
4) FIEBRE 4 *M	4:5 80%	4:5 80%	4:5 80%	4:5 80%	4:5 80%	4:5 80%	0:5 0%	4:5 80%
5) TESTIGOS 5*M	3:3 48%	3:3 100%	1:3 48%	3:3 100%	3:3 100%	3:3 100%	0 0%	3:3 100%
5) DESAFIO 5*M	2:5 40%	3:5 60%	2:5 40%	4:5 80%	4:5 80%	5:5 100%	0 0%	5:5 100%
Día 5 post D. Bacter.								
5) FIEBRE 5 *M	0:5 0%	0:5 0%	0:5 0%	1:5 20%	1:5 20%	0:5 0%	0 0%	2:5 40%
6) TESTIGOS 6*M	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	3:3 100%	3:3 100%	0 0%	0 0%
6) DESAFIO 6*M	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	5:5 100%	5:5 100%	0 0%	0 0%
Día 7 post D. Bacter.								
6) FIEBRE 6*M	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	4:5 80%	4:5 80%	0 0%	0 0%
7) TESTIGOS 7*M	0 0%	0 0%	1:3 48%	0 0%	0 0%	3:3 100%	0 0%	2:3 81%
7) DESAFIO 7*M	0 0%	0 0%	3:5 60%	4:5 80%	4:5 80%	5:5 100%	4:5 80%	5:5 100%
Día 9 post D. Bacter.								
7) FIEBRE 7*M	0 0%	0 0%	1:5 20%	2:5 40%	1:5 20%	2:5 40%	1:5 20%	2:5 40%

FIEBRE: 39.6 C a 41.7 C

T° NORMAL: 37 C a 39.5 C

D= Desafío

M=muestreo

PREVENCIÓN
FALLA DE ORIGEN

5.5) Análisis de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas del suero de animales que desarrollaron fiebre en condiciones de infección natural (campo).

Se establecieron rangos de temperatura febril por arriba de lo normal según lo marca la literatura ¹²¹ (39.6 C a 41.7 C), para poder determinar y evaluar de forma más real, la temperatura de dichos animales, ya que una gran mayoría de ellos salían del grupo a evaluar y su temperatura varió por cuestiones de manejo o condiciones medio ambientales. Por esta razón se consideró como animales con temperatura normal, a aquellos que se encontraban en el rango de 37 C a 39.5 C, los cuales eran básicamente animales convalecientes y clínicamente sanos.

En el CUADRO 3.4, se resume el total de muestras obtenidas de animales en campo, en la región de Jilotepec, Edo. de Méx. y la de los que presentaron fiebre, lo cual correspondió a animales que cursaron con cuadro clínico de neumonía, así como aquellos que no presentaron fiebre. Como se puede apreciar en el cuadro, los individuos que desarrollaron fiebre, reconocieron en un 60% a la proteína 5 y 6 con un 40% a la proteína 1. Sin embargo, en animales que no desarrollaron esta condición, reconocieron en porcentajes relativamente más altos, 70.37% y 77.77% a la proteína 5 y 6 respectivamente. Solo se pudieron obtener datos de temperatura en ésta región.

CUADRO 3.4 Frecuencia y porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas del suero de animales muestreados en campo en la región 1 (JILOTEPEC, EDO. DE MÉX.), y que presentaron cambios de temperatura corporal.

PROTEÍNA	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6	Pt7	Pt8
FIEBRE	6:15 40%	6:15 13.33%	5:15 33.33%	5:15 33.33%	9:15 60%	9:15 60%	3:15 20%	4:15 26.66%
T° NORMAL	7:27 25.92%	2:27 3.70%	6:27 22.22%	9:27 33.33%	19:27 70.37%	21:27 77.77%	1:27 3.70%	7:27 25.92%

FIEBRE: 39.6 C a 41.7 C

T° NORMAL: 37 C a 39.5 C

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.6) Análisis de reconocimiento antigénico de animales que desarrollaron fiebre en condiciones experimentales.

En el caso de los animales desafiados experimentalmente (CUADRO 3.5), se les evaluó la temperatura desde el día 1 del calendario de inoculación (CUADRO 2.1), hasta finalizar dicho evento. Permitiendo monitorear la temperatura de los animales antes y durante el desafío experimental y establecer, si la temperatura corporal de los individuos podía influir en el reconocimiento de las proteínas evaluadas. En el CUADRO 3.3, se observa que el reconocimiento por parte de los animales que no presentaron fiebre, del grupo testigo, fue mayor, mientras que en los animales del grupo desafiado, aumentó el reconocimiento paulatinamente a las 8 proteínas, siendo el 4° muestreo, el de mayor reconocimiento, lo cual coincidió con la fecha del desafío bacteriano y el marcado estado febril que desarrollaron cuatro de los cinco animales desafiados en esa fecha. En la FIGURA 11, se puede apreciar la variación de temperatura que desarrollaron los animales del grupo testigo con respecto a la del grupo experimental, durante el curso del desafío según la fecha del calendario de inmunización.

CUADRO 3.5 Frecuencia y porcentaje de reconocimiento antigénico a las 8 proteínas del total de sueros obtenidos a partir de animales muestreados en condiciones experimentales distribuidos según los cambios de temperatura corporal.

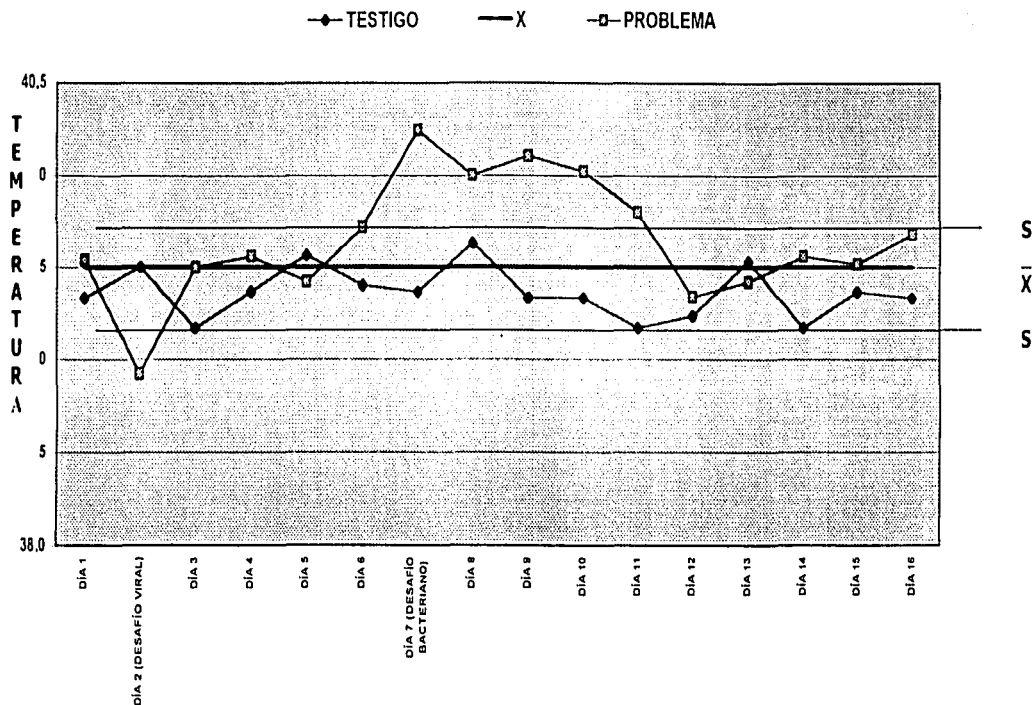
PROTEÍNA	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6	Pt7	Pt8
FIEBRE	8:25 32%	9:25 36%	11:25 44%	14:25 56%	17:25 68%	21:25 84%	11:25 44%	20:25 80%
T° NORMAL	15:31 48.38%	13:31 41.93%	19:31 61.29%	20:31 67.74%	25:31 80.64%	27:31 80.09%	20:31 64.51%	27:31 80.09%

FIEBRE: 39.6 C a 41.7 C

T° NORMAL: 37 C a 39.5 C

INSTITUTO VETERINARIO
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 11



TEMPERATURA DE ANIMALES MUESTREADOS DURANTE EL DESAFÍO EXPERIMENTAL.

TESTIGO: T (Promedio del grupo testigo) PROBLEMA: P (Promedio del grupo desafiado)

RAMA DE CUARENTA

IX. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo, se evaluó la dinámica de la respuesta inmune humoral a algunos antígenos de *M. haemolytica* que fueron reconocidos por anticuerpos de animales sanos, enfermos y Convalecientes de cuadros neumónicos naturales y de animales desafiados experimentalmente. Tanto la leucotoxina (LKT) como las proteínas de membrana externa (PME) de la bacteria, despiertan una respuesta inmune específica, que puede ser parte de una respuesta protectora contra la enfermedad, tanto en condiciones de campo como experimentales.

a) Leucotoxina

En esta investigación se evaluaron los títulos promedio de anticuerpos antileucotoxina obtenidos de animales muestreados tanto a nivel de campo, como desafiados experimentalmente.

- Muestreo de campo

De los muestreos realizados en campo, se pudo observar, que los títulos más altos correspondieron a los animales convalecientes con un título promedio de 4, estos descendieron en los animales clínicamente enfermos a 2 y la respuesta humoral de los animales clínicamente sanos, fue relativamente alta, con título promedio de 3. Sin embargo, el análisis de varianza permitió establecer diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$), entre los títulos de anticuerpos anti-LKT de *M. haemolytica* entre convalecientes y enfermos. En tanto que entre enfermos y sanos, no hubo diferencia estadística. Dichos resultados permiten establecer que el mayor título de anticuerpos anti-LKT, se obtienen en aquellos estados posteriores a la forma más activa de la enfermedad, indicando que la respuesta inmune se exacerba con mejor eficiencia, una vez que se ha expuesto al individuo al antígeno. Sugiriendo que la respuesta tiene elementos de memoria inmune y el estímulo de la presencia de la LKT en el pulmón del animal enfermo mejora el título sérico de la misma.

- Muestreo experimental

En los animales desafiados experimentalmente, la respuesta inmune humoral hacia la leucotoxina, varió notablemente en los animales del grupo testigo, desde el primer muestreo, los títulos de anticuerpos se encontraban elevados, con un promedio de 8.31, en comparación a los del grupo desafiado que presentaron títulos promedio de 7.84. Dado que los animales eran negativos

en la región de origen, esto sugiere que los animales desarrollaron un cuadro neumónico asociado al transporte en el periodo de adaptación en la unidad experimental. Para el segundo muestreo, los títulos se elevaron aún más: 8.64 en los animales que funcionarían como testigo, por arriba de los animales desafiados. Sin embargo, posterior al segundo muestreo los títulos en este grupo comenzaron a descender y el día 16, fecha del último muestreo, se equilibraron en 7.3. (FIG. 2). Esta variación de anticuerpos, en el grupo testigo se puede atribuir al estrés del transporte del rancho donde se compraron (Jaltenco, Edo. de Méx.) al Instituto donde se realizó el experimento (Cuajimalpa, Méx. D.F), así como al cambio de instalaciones e incluso de alimentación. Aún cuando a estos animales no se les desafió con antígenos virales o bacterianos, sí se les administró SSF por vía endotraqueal.

Es importante señalar, que en este caso, los animales podían haber desarrollado una infección previa a *M. haemolytica* que al inmunodeprimirse, ésta se exacerbó. Los animales se muestrearon en su lugar de origen (Jaltenco Edo. de Méx.) resultando negativos para anticuerpos contra las PME, pero no se realizó prueba alguna para determinar anticuerpos anti-LKT. Se trasladaron a las instalaciones del INIFAP, dos semanas después de dicho muestreo, sin ningún período de tiempo posterior a su llegada que permitiera su adaptación a las nuevas instalaciones. Esto se realizó con la finalidad de inducir un mayor estado de estrés y por lo tanto de inmunosupresión, que reprodujera con mayor eficiencia, las condiciones que inducen la presentación del cuadro neumónico, en este caso de tipo experimental. El posible contacto con animales enfermos de neumonía en el mismo rebaño, antes de su traslado al INIFAP así como las nuevas condiciones ambientales (temperatura, humedad, precipitación pluvial., etc.) , en las que los animales se encontraban en dichas instalaciones, podrían haber alterado de manera relevante el estado inmunológico tanto del grupo testigo como del grupo desafiado.

Los títulos de anticuerpos anti-LKT del grupo testigo, presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el segundo (día 2: desafío viral) y quinto muestreo (día 12: posdesafío bacteriano), el resto de los muestreos no presentaron diferencia estadística. En cambio, para el grupo desafiado, solo el cuarto muestreo (día 7: desafío bacteriano) presentó diferencia altamente significativa ($p \leq 0.01$), con respecto al resto de los muestreos.

Laurence y colaboradores han reportado que en animales clínicamente sanos, *M. haemolytica* se encuentra presente en bajas cantidades en los pasajes nasales aislándose predominantemente el biotipo A serotipo 2. La exposición de ganado sano a agentes estresantes,

infecciones virales, cambios en las prácticas de manejo (transporte para la comercialización del ganado) y cambios en las condiciones del medio ambiente (calor y frío) permiten el crecimiento explosivo de la bacteria y la colonización selectiva de ésta en el tracto respiratorio superior. *M. haemolytica* ha sido aislada postmortem de una o más áreas seleccionadas de la cavidad nasal a pesar de obtener cultivos negativos antemortem. Esto sugiere que en el ganado sano puede ocurrir la recolonización del tracto respiratorio superior.⁶⁵ El comportamiento de los animales experimentales antes del desafío sugiere que desarrollaron un cuadro subclínico de neumonía con participación de *M. haemolytica* que liberó LKT y estimuló la respuesta serológica, la cual decayó en 12 días en la medida que los animales se recuperaron.

Los animales desafiados experimentalmente presentaron un patrón inmunológico de anticuerpos antileucotoxina muy variable a diferencia de los animales muestreados en campo y de los animales del grupo testigo, ya que éstos, presentaron un título promedio de 7.84 anticuerpos antileucotoxina al día 1 del calendario del desafío, éste se encontró por debajo del título promedio que alcanzaron los animales del grupo testigo (8.31) al mismo día, a pesar de que hasta este momento no se le había administrado ningún tratamiento. Posteriormente en el segundo muestreo (día 3) que correspondió al desafío viral, los animales del grupo desafiado elevaron su respuesta (8.24) casi al mismo nivel que alcanzaron los del grupo testigo (8.64), para el día 3 postdesafío viral, el título descendió a 7.84 el mismo título con que comenzaron éstos animales desde el primer muestreo. Para el día 7, que correspondió al desafío bacteriano, los títulos promedio continuaron descendieron (7.64). Este descenso en los títulos a la LKT cinco días después del desafío viral, sugiere también la posibilidad de que el virus exacerbó el cuadro neumónico natural del que se estaban recuperando los animales (testigos y desafiados). Sin embargo para el día 5, posdesafío bacteriano, los títulos se elevaron (8.06) y lo continuaron haciendo hasta el último muestreo que correspondió al día 9, posdesafío bacteriano, alcanzado títulos promedio de 8.5.

La infección viral previa al desafío bacteriano, genera inmunosupresión, lo cual podría explicar la caída de títulos de anticuerpos antileucotoxina posterior al desafío viral y como estos mismos se elevan posterior al desafío bacteriano. Además el uso de dexametasona durante el desarrollo del experimento, debió reducir aún más la capacidad de la respuesta inmune de los animales.

La recolonización por *M. haemolytica* del tracto respiratorio superior, ha mostrado estar asociada al manejo y la relación medio ambiente-estrés, así como también a las infecciones virales

naturales o experimentales, con virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y el virus de la parainfluenza tipo 3 (PI3). Laurence y colaboradores, demostraron que la infección viral, con presencia en el suero y cavidad nasal de anticuerpos anti-*M. haemolytica*, permite la colonización del tracto respiratorio inferior por la bacteria. Una vez que ha ocurrido la colonización de esta zona la bacteria puede ser cultivada a partir del aire traqueal.⁶⁵

Cravens y colaboradores, evaluaron diferentes biológicos a partir de *M. haemolytica* y sus diferentes antígenos y se concluyó que la LKT era uno de los principales antígenos, que debía incluirse en la formulación de los biológicos, ya que demostró inducir una elevada respuesta de anticuerpos neutralizantes a la LKT, que se traducían en una mejor inmunidad protectora.¹²² Si éste antígeno, es uno de los principales expresados por la bacteria durante su fase de crecimiento logarítmico mientras invade al pulmón, es lógico que exista entonces, una mayor respuesta inmune hacia la LKT que se expone ampliamente al sistema inmunológico durante la fase posterior a la forma más aguda de la enfermedad.

b) Proteínas de Membrana Externa de *M. haemolytica*.

Otros antígenos evaluados de *M. haemolytica* fueron las proteínas de membrana externa, numerosas proteínas mayores de esta fracción han sido identificadas en esta bacteria, estas incluyen proteínas de 100, 89.2, 42, 40 y 30 kDa.^{123,124,115} En estudios realizados por Confer y colaboradores en 1986, se identificaron proteínas de membrana externa de 105, 87 y 30 kDa a partir de sobrenadantes de cultivo durante diferentes períodos de incubación. Estas se obtuvieron de forma muy similar al estudio descrito por Moiser y colaboradores en 1987¹²⁵, quienes utilizaron densitometría y análisis de "inmunolectrotransferencia" para identificar antígenos de *M. haemolytica* a partir de precipitados con sulfato de amonio de sobrenadantes de cultivo ricos en leucotoxina. Confer y colaboradores en 1986, no encontró proteínas de 42 y 40 kDa en los sobrenadantes de cultivo, lo cual podría indicar que estas proteínas se encuentran firmemente adheridas al peptidoglicano de la membrana externa o bien, son inestables en el sobrenadante.¹²⁶

En esta investigación se trabajó con 8 proteínas de membrana externa de 94, 88, 68, 63, 53, 45, 35 y 27 kDa, obtenidas mediante sonicado a partir de aislamientos de *M. haemolytica* biotipo A serotipo 2, Convalecientes de pulmones con lesiones neumónicas sugestivas de

pasteurelisis. Estas proteínas se seleccionaron con base al reconocimiento demostrado por los sueros de los animales muestreados en campo, así como los muestreados experimentalmente.

En la evaluación de la respuesta inmune hacia las PME, se tomaron en cuenta varios factores que podrían haber alterado el reconocimiento de las mismas por parte de los sueros de los diferentes grupos muestreados en condiciones de campo, como experimentales. Estos factores fueron las diferentes zonas geográficas muestreadas, las diferentes condiciones de los animales muestreados; clínicamente enfermos, convalecientes, sanos, desafiados y testigos., así como la temperatura corporal de los animales durante la enfermedad en el caso de los que la cursaron.

- Efecto de la región geográfica.

En el análisis de frecuencia de reconocimiento por las muestras obtenidas en cada una de las regiones (CUADRO 3.1) . La mayoría de ellas, reconoció a la proteína 5 de 53kDa (62%) y a la 6 de 45kDa (68%). Incluso en Dolores Hgo., en donde los sueros de los animales muestreados no reconocieron ninguna proteína, la proteína 5 y 6, que fueron reconocidas aunque en porcentaje muy bajo (22%). De hecho el reconocimiento de las proteínas 5 y 6 no fue inferido por la región de muestreo ($p \geq 0.05$). En otras regiones, como Temoaya, se reconocieron en mayor porcentaje otras proteínas, 50% de los sueros respondieron con la proteína 7 (35kDa) y 56% con a la proteína 8 (27kDa); en Jaltenco reconocieron con 63% la proteína 3 (68 kDa) y 50% a la proteína 8 (27kDa); Chimilpa reconoció en un 100% a la proteína 1 (94kDa), 67% a la proteína 3 (68kDa), 83% a las proteínas 4 (63kDa) y 8 (27kDa); Cuautitlán reconoció con un 50% a la proteína 1(94kDa) y Apan, Hgo con un 94% a la proteína 8(27kDa).

En Jilotepec, se observó cierta homogeneidad, con respecto al patrón de reconocimiento de las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* por los sueros de animales enfermos que reconocieron a las proteínas 1(31%), 3(31%),4(33%), 5(67%), 6(71%), 7(10%) y 8(26%) (FIG. 7).

En los animales experimentales, tanto desafiados como testigos reconocieron con un 84% a la proteína 8 (27kDa), 61% la proteína 4 (63kDa), 56% la proteína 7 (35kDa) y 54% la proteína 3 (68kDa). Este patrón de reconocimiento no corresponde al observado en Jaltenco, lugar de origen de los animales, lo que sugiere que la cepa involucrada fué particular del Rancho de origen.

Considerando también, que los animales que se compraron para el experimento, se encontraban en contacto con animales de diferentes orígenes, que no se cuarentenaban a su llegada al rancho, además de que existe una constante movilización de ganado, ya que la finalidad de dicho lugar, es la engorda y comercialización del mismo.

Esta variación de reconocimiento proteínico en las diferentes zonas, pudo estar influenciada por los serotipos y las cepas de *M. haemolytica* presentes o dominantes y por las condiciones medio ambientales, la prevalencia de ciertos serotipos varía en las distintas.¹²⁷

El análisis estadístico de máxima verosimilitud (SAS), demostró que al menos una de las nueve regiones muestreadas, influyó significativamente en el reconocimiento de las proteínas 1 (94kDa), 7(35 kDa) y 8 (27 kDa) ($p \geq 0.01$), este resultado indica que estas proteínas podrían ser de interés, en el reconocimiento de cepas de *M. haemolytica*. (Anexo 1).

- Efecto de los muestreos.

Del análisis de frecuencia del total de animales muestreados, tanto en campo como experimentales (211), el mayor porcentaje reconoce a la proteína 5 (53 kDa) con 63% y a la proteína 6 (45 kDa) con 68% y en menor porcentaje (55%) la proteína 8 (27kDa) mientras que el resto de las proteínas fueron reconocidas con un porcentaje que varió de entre 20 al 30%.

Es importante señalar que la evaluación estadística de máxima verosimilitud mostró que al menos un muestreo podría estar influyendo significativamente en el reconocimiento de las proteínas 1(94 kDa), 2 (88kDa), 6 (45kDa), 7 (35kDa) y 8(27kDa). Mientras que el muestreo no modificó el reconocimiento de las proteínas 3, 4 y 5 ($p > 0.05$). Esto sugiere que las proteínas 1, 2, 6, 7 y 8 podrían ser de interés en el reconocimiento del estado del animal en el proceso neumónico. Sin embargo, solo las proteínas 5 y 8 tuvieron diferente patrón de reconocimiento ($p < 0.01$), entre sanos, enfermos, convalecientes, testigos y desafiados (Anexo 1).

- **Efecto del grupo animal.**

Grupo de Campo.

En cuanto a la evaluación del reconocimiento proteínico por los diferentes grupos muestreados, animales caracterizados como sanos, enfermos y convalecientes, el análisis de frecuencia de los animales en campo mostró, que tanto los animales enfermos como los Convalecientes y sanos, reconocieron en mayor porcentaje a las proteínas 5 y 6 y los animales sanos reconocieron adicionalmente en mayor porcentaje a la proteína 8 con un 52% (CUADRO 3.2). Sin embargo, solo la proteína 5 y 8 modificaron significativamente ($p < 0.01$) su reconocimiento por los sueros de los animales sanos, enfermos y convalecientes. Mientras la proteína 5 incrementó su porcentaje de reconocimiento de los sanos a los enfermos y los convalecientes, 41%, 59% y 65% respectivamente, el reconocimiento de la proteína 8 se redujó en forma inversa: 52%, 47% y 32%. Es posible que la proteína 5 indique el reconocimiento de un antígeno de infección activa, mientras la proteína 8 puede corresponder a un antígeno de respuesta, que consume los anticuerpos en el proceso de infección y recuperación.

Cuando *M. haemolytica* en condición de enfermedad prolifera e invade el parénquima pulmonar desencadena una respuesta inmune humoral a los antígenos que libera, por lo que los antígenos reconocidos previos al proceso patológico y los posteriores a la enfermedad, podrían estar involucrados activamente en la patogenia de la misma y en el perfil de reconocimiento, este podría ser el caso de la proteína 5.

Grupo experimental.

De los animales muestreados experimentalmente se obtuvieron 7 muestreos tanto del grupo testigo (3 corderos), como del grupo desafiado (5 corderos), el análisis de frecuencia, demostró una variación notable de reconocimiento a las 8 proteínas entre los dos grupos. Los animales del grupo testigo reconocieron principalmente a la proteína 6 (45 kDa) (86%) y en segundo lugar a la proteína 8 (27 kDa) (81%), posteriormente la proteína 5 (53kDa) (67%), siguiéndole la proteína 7 (35kDa) (52%), finalmente la proteína 4 (63kDa) (52%) y el resto de las proteínas (1, 2 y 3) con un porcentaje promedio de reconocimiento del 46%.

En este grupo se observó un patrón variable de proteínas reconocidas en diferentes tiempos posdesafío, desde el primer muestreo hasta el último, a pesar de que los animales a desafiar se evaluaron previo al desafío resultando negativos. En el primer muestreo de desafío, la inmunoelectrotransferencia demostró un fuerte reconocimiento con afinidad hacia las 8 proteínas seleccionadas así como a otras de reconocimiento adicional y de marcada afinidad (FIG. 8), de pesos moleculares variables. Con estos hallazgos se corroboró que la respuesta inmune de los animales desafiados, se encontraba activa, probablemente desde que salieron del rancho donde se adquirieron ó bien, haberla desarrollado durante el transcurso del manejo de los mismos.

Para el día 2 que correspondió al desafío viral, se reconoció el total de las proteínas, excepto la proteína 2. Al día 3, posdesafío viral, la respuesta inmune fue nula para las 6 primeras proteínas, mientras que las proteínas 7 y 8 se reconocieron al 100%. Sin embargo, para el día 7 que correspondió al desafío bacteriano y tomando en cuenta que es hasta este momento cuando los animales entraron en contacto con la bacteria viva al ser inoculada por vía endotraqueal, se recuperó el reconocimiento a 7 de las 8 proteínas en un 100% excepto la proteína 7 que se reconoció en un 20% y se siguieron reconociendo una serie de proteínas adicionales a las establecidas previamente. Para el día 5 posdesafío bacteriano, las proteínas reconocidas por el total de los sueros fueron la 6 y 8 en un 100%, posteriormente la 4, 5 y 7 en el 80%.

Esto revela importantes cambios en el estado inmunológico de los animales previo al desafío viral, ya que la infección primaria del virus aparentemente está jugando un papel muy importante, tanto en la patogenia de la enfermedad, como en la respuesta inmune a los agentes involucrados, ya sea para potencializar a *M. haemolytica* como agente secundario al disminuir las defensas durante la infección viral al hospedador o bien para inducir la expresión de antígenos de la bacteria en el proceso inflamatorio que se desencadena.

Aunque los animales desafiados invariablemente reconocieron con mayor intensidad las proteínas 5 y 6 de las 8 seleccionadas para esta evaluación, en el análisis de inmunoelectrotransferencia se observó además el reconocimiento adicional de proteínas diferentes al patrón elegido para ésta evaluación. Fue clara la diferencia en cuanto al reconocimiento proteínico entre los animales muestreados en campo y los desafiados experimentalmente, estos últimos reconocieron más proteínas que los primeros, probablemente asociado a las condiciones en el grupo desafiado.

De lo anterior se puede determinar que mientras los animales en campo reconocieron en mayor porcentaje a la proteína 5 (53 kDa) y 6 (45 kDa), los animales del grupo experimental reconocieron de igual manera a la proteína 6 (45 kDa) y 8 (27 kDa). Cabe mencionar que esta última proteína, se reconoció en un 52%, en los animales clínicamente sanos muestreados en campo. Sin embargo, en el análisis estadístico de máxima verisimilitud (SAS) se observó que al menos uno de los diferentes grupo, influyó significativamente ($p > 0.01$) en el reconocimiento de las proteínas 5 (53kDa) y 8 (27 kDa) (Anexo 1).

Es posible que las proteínas, 7 (35 kDa) y 8 (27 kDa), referidas en este trabajo correspondan a las proteína descritas por Squire y colaboradores ¹¹⁴ quienes reportaron que *M. haemolytica* biotipo A serotipo 1 y 2 tiene dos proteínas principales de membrana externa de 43 y 30 kDa, ya que los pesos moleculares son muy similares.

En trabajos realizados por Rossmanith ¹²⁸ se encontró, que generalmente los perfiles de PME a partir de aislamientos de *M. haemolytica* del mismo serotipo, son muy similares, a diferencia de lo que ocurre en lo biotipos A y T, que presentan diferentes proteínas, tanto en tamaño como en número de acuerdo a la prominencia de las bandas que revelaron las inmunoelectrotransferencias. Todos los aislamientos del biotipo A, son similares, excepto los serotipo 1 y 11 que además de compartir dos PME, que tienen un tamaño de aproximadamente 43 y 29 kDa, tienen adicionalmente una banda de 40 kDa. Los aislamientos del biotipo T, serotipo 3, 4 y 10 presentan idénticos perfiles proteínicos entre ellos mismos, pero difieren del biotipo A en contener dos prominentes bandas de aproximadamente 43 y 36 kDa y una banda de aproximadamente 25 Kda.¹²⁸ Los resultados obtenidos en este trabajo, fueron en general muy similares a los obtenidos por otros investigadores. Squire y colaboradores ¹¹⁵ reportaron que *M. haemolytica* biotipo A, serotipos 1 y 2, tiene dos proteínas principales de membrana externa de 43 y 30 kDa. Esto resultados son similares a los obtenidos por Rossmanith ¹²⁸, en contraste con Schuriy y col. 1984, que obtuvieron tres prominentes bandas a partir de *M. haemolytica* y *Pasteurella multocida*.¹²⁸

En el presente trabajo se aisló *M. haemolytica* biotipo A serotipo 2 y con esta misma cepa se desafió experimentalmente. En el caso de los animales clínicamente enfermos, muestreados en campo, que no murieron del proceso, no se realizó el aislamiento de la bacteria y por lo tanto se desconoce el serotipo involucrado, aunque se sabe que el serotipo más común aislado de borregos en México es el A2. Sin embargo, existen reportes que mencionan la existencia de reacción cruzada

para las PME, entre los diferentes serotipos de un mismo biotipo, así como de cepas no tipificables.

129

Estudios realizados por Confer y colaboradores, para comparar los antígenos que expresa *M. haemolytica* serotipo A1, *in vitro* e *in vivo*, demostraron mediante PAGE-SDS e inmunoelectrotransferencias que las bacterias que crecieron *in vivo*, expresaron antígenos proteínicos de alto peso molecular (mayores de 150 kDa). Las bacterias que crecieron *in vitro*, en cambio mostraron proteínas de 49 y 26 kDa. La concentración de proteínas principales de 30, 42, 55, 71 y 100 kDa, fue similar entre los organismos que crecieron en tres diferentes condiciones de cultivo. Aunque los antígenos de alto peso molecular fueron únicos para las cámaras de crecimiento bacteriano, siendo reconocidos por el suero de ganado que había sido vacunado con medio de cultivo sólido de *M. haemolytica*, muerta con formalina y que resultaron resistentes al desafío con el organismo vivo. Este reconocimiento por el suero de ganado resistente a *M. haemolytica*, vacunado con medio de cultivo bacteriano sólido, indica que los antígenos de alto peso molecular de las cámaras de crecimiento bacteriano, podrían ser precursores de determinantes antigénicos de otras proteínas de *M. haemolytica*.¹³⁰

La inmunidad contra *M. haemolytica* no está claramente entendida.¹³¹ Los anticuerpos séricos contra antígenos de superficie y contra la exotoxina, parecen ser los más importantes en aumentar la resistencia al inducir la enfermedad en forma experimental.¹³² y la respuesta de anticuerpos a una gran cantidad de proteínas específicas de *M. haemolytica* se ha correlacionado con la resistencia a la enfermedad, obteniendo excelentes resultados.¹³³ Vacunas vivas, muertas, así como extractos de la bacteria han sido estudiados bajo condiciones de experimentación y de campo, con diferente éxito en lograr aumentar la respuesta a la pastereiosis neumónica.^{134,135}

Otros estudios sugieren que los anticuerpos contra la leucotoxina y los antígenos de superficie, son probablemente los más importantes en la resistencia a la enfermedad. La relevancia de utilizar PME como estimulantes de la inmunidad ha sido demostrada en otras bacterias gram negativas.

A partir de la serovariedades 1, 2 y 6 serotipo A de *M. haemolytica*, se extrajeron PME por Morton y colaboradores en 1995¹⁰⁴ evaluando el uso de dos procedimientos de extracción (Sacosil y centrifugación por gradiente de sucrosa), resultando la extracción por sacosil, la mejor opción

para obtener un mayor número de proteínas (30.5, 37, 38.5, 44.5, 49, 62.5, y 82 kDa), además de ser menos laborioso.¹³⁶

Morton y colaboradores, en 1995, demostraron que el ganado fue resistente al desafío experimental con *M. haemolytica*, después de ser inmunizado con PME insolubles en sarcosil. En este estudio, los anticuerpos contra las PME con pesos moleculares de 16.5, 37, 45.5, 50.5 y 84.4 kDa mostraron una correlación significativa con la resistencia.¹⁰⁴

- Efecto de la temperatura

Los datos de reconocimiento proteínico se correlacionaron con la temperatura corporal, en los animales que desarrollaron fiebre en la fase clínica de la enfermedad. En el caso de los animales muestreados en campo, solo se evaluó la zona de Jilotepec, dadas las facilidades para realizarlo, mientras que a los animales desafiados, se les evaluó desde el primer muestreo, hasta finalizar dicho evento. Esto se hizo, para tratar de establecer alguna relación en cuanto al estado febril que desarrollaban los animales que cursaron con la enfermedad clínica y el reconocimiento de proteínas de la bacteria por parte del sistema inmune bajo los diferentes estados de salud en los que esta misma se podía encontrar dentro de los hospedadores a evaluar.

El análisis estadístico de máxima verisimilitud (SAS) reveló que la variable de temperatura corporal registradas en el presente trabajo, se encuentran significativamente relacionadas con el reconocimiento de las proteínas 1 (94kDa) y altamente significativa para la proteína 2 (88kDa), 4 (63kDa), 6(45kDa), 7(35kDa) y 8 (27kDa) de la fracción de membrana externa de *M. haemolytica*. La condición febril fue el parámetro que con mayor seguridad definió la condición de neumonía, por lo que el reconocimiento de éstas proteínas estuvo influido por la condición de enfermedad.

Donachie y Gilmour¹⁰⁸ compararon una cepa de *M. haemolytica* serotipo 2, recuperada de fluido pleural de un borrego con pastereiosis neumónicas, a la misma cepa cuando se le hizo crecer en medio de cultivo, encontrándose diferencias en la expresión de las proteínas de 55, 70 y 100 kDa. Numerosos estudios han demostrado que las propiedades antigénicas de *M. haemolytica* pueden variar, tanto en condiciones *in vivo*, como *in vitro*.

El reconocimiento de las 8 proteínas se modificó significativamente en las cuatro variables analizadas, región geográfica, momento del muestreo, presencia o no de fiebre y condición de los animales sano, enfermo, convaleciente, testigo y desafiado. Los animales interactúan entre sí, pero estos resultados apuntan a la necesidad de un análisis particular a la respuesta de reconocimiento. Por otra parte, el reconocimiento de la proteína 5 decayó de los sanos a los enfermos y a los convalecientes, lo que puede sugerir el consumo de los anticuerpos en el proceso de enfermedad. La elevada frecuencia de reconocimiento de esta proteína (55%) sugiere adicionalmente que presenta buena antigenicidad y podría ser un buen indicador de animales expuestos a la bacteria con desarrollo de enfermedad (100% en desafiados) y aún subclínica (52% en animales sanos).

Por el contrario la proteína 3 tuvo un bajo reconocimiento 35% y no modificó este comportamiento en forma significativa con las variables estudiadas por lo que en principio parece poco interesante para trabajos futuros.

Las proteínas 1, 7 y 8, fueron significativamente afectadas por la región de muestreo, las proteínas 1 y 7 tuvieron una baja frecuencia de reconocimiento (27%), por lo que podrían estar relacionadas con cepas particulares de *M. haemolytica*.

X. CONCLUSIONES.

Sin duda alguna son numerosas las investigaciones que sustentan la importancia de *M. haemolytica*, así como de los antígenos que expresa al infectar al hospedador y causar lesión. La respuesta inmunológica generará anticuerpos específicos contra los antígenos más expuestos e inmunogénicos de la bacteria.

- *M. haemolytica* expresa diferentes antígenos en distintas condiciones de crecimiento, de tal manera que su presencia se encuentra alterada tanto en condiciones naturales de la enfermedad como en condiciones experimentales, induciendo una respuesta inmune humoral específica en cada condición.

- Los títulos de anticuerpos-antiLKT mostraron una respuesta inmune humoral específica tanto en condiciones de campo como experimentales, desarrollándose altos títulos en las situaciones posteriores a las formas más activas de la enfermedad, animales convalecientes y muestreos posdesafiados con la bacteria viva.
- Los animales desafiados experimentalmente corroboraron el hecho de que *M. haemolytica* participa como flora saprofita de vías respiratorias altas y bajo condiciones de estrés, se torna patógena, proliferando en las vías respiratorias bajas, de tal manera que induce una respuesta inmune específica contra aquellos antígenos que se exponen al sistema inmune y que participan activamente en el proceso de enfermedad. Dado el hecho de que estos animales mostraron títulos de anticuerpos antileucotoxina altos, antes del desafío con *M. haemolytica* viva.
- Las condiciones medio ambientales, en las diferentes zonas geográficas muestreadas, podrían influir en la expresión de ciertos antígenos de *M. haemolytica*, al seleccionar distintas cepas de la bacteria. Estadísticamente esta variable resultó significativa para el reconocimiento de las proteínas 1 (94 kDa), 7 (35 kDa) y 8 (27 kDa), sugiriendo que al menos una región de las 9 muestreadas influye directamente en su expresión. Sin embargo, hace falta realizar más estudios, ya que las variaciones que pudiera desarrollar la bacteria en este aspecto, solo se han evaluado en condiciones *in vitro* (medios de cultivo).

- Las proteínas 1 (94 kDa), 2 (88 kDa), 6 (45 kDa), 7 (35 kDa) y 8 (27 kDa), parecen ser las principales proteínas expresadas por *M. haemolytica* tanto en condiciones de campo como en condiciones de experimentación, así lo indicaron los altos niveles de significancia al análisis estadístico para la variable de muestreo.
- Las PME de 8 (27 kDa) y 7 (35 kDa) de *M. haemolytica*, podrían estar expresándose cuando la bacteria se encuentra en vida saprófita ó bien en forma patógena durante el desarrollo de la enfermedad en el hospedador. Es posible que estas proteínas, correspondan a las ya descritas por Squire y colaboradores ¹¹⁵ de 30 y 43 kDa respectivamente.
- Los diferentes grupos en los que se dividieron a los animales tanto en condiciones de campo (sanos, enfermos y convalecientes) como experimentales (testigos y desafiados), influyeron en el reconocimiento de las proteínas 5 (53 kDa) y 8 (27 kDa), las cuales presentaron altos niveles de significancia para dicha variable.
- En condiciones de experimentación, los anticuerpos de estos animales reconocieron una mayor cantidad de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* adicionales a las descritas de pesos moleculares variables que podría estar influenciada por las condiciones antes mencionadas. Sin embargo, no existen información que sustente esta posibilidad.
- La temperatura corporal de los animales tanto de fiebre de 39.6 a 41.7 como de temperatura normal de 38-39.5, influye significativamente en el reconocimiento de la proteína 1 (94 kDa), 2 (88 kDa), 4 (63 kDa), 6 (45 kDa), 7 (35 kDa) y 8 (29 kDa) de membrana externa de *M. haemolytica*.

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos que confieren protección contra *M. haemolytica*, es de gran importancia para tratar de desarrollar mejores productos biológicos que prevengan la infección. Sin embargo, queda camino por recorrer en lo que este punto se refiere, ya que la bacteria expresa una gran cantidad de antígenos en diferentes situaciones (*in vivo* e *in vitro*) lo cual dificulta esclarecer la participación de cada uno de estos en la patogenia de la enfermedad.

THESE
FALLA DE ORIGEN

XI. ANEXO 1.

ANÁLISIS DE ESTIMACIÓN DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.

CUADRO A1.1. Análisis de la respuesta a la proteína 1 de 94 kDa, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	G.L	ESTIMADOS	ERROR ESTANDAR	Chi-Cuadrada	Pr > ChiCuadrada	Significancia
Región	1	-0.1694	0.0695	5.9508	0.0147	Significativo **
Muestreo	1	0.2557	0.1038	6.0717	0.0137	Significativo **
Temperatura	1	-0.0502	0.0145	12.0293	0.0005	Significativo *
Grupo	1	0.0111	0.1085	0.0104	0.9187	No Significativo

* = 0.05 ** = 0.01

CUADRO A1.2. Análisis de la respuesta a la proteína 2 de 88 kDa, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	G.L	ESTIMADOS	ERROR ESTANDAR	Chi-Cuadrada	Pr > ChiCuadrada	Significancia
Región	1	-0.1054	0.0791	1.7762	0.1826	No Significativo
Muestreo	1	0.1762	0.1076	2.6819	0.1015	Significativo **
Temperatura	1	-0.0856	0.0178	23.2136	0.0001	Significativo **
Grupo	1	-0.0877	0.1260	0.4847	0.4863	No Significativo

* = 0.05 ** = 0.01

Temperatura
FALLA DE ORIGEN

CUADRO A1.3. Análisis de la respuesta a la proteína 3 de 68 kDa, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	G.L	ESTIMADOS	ERROR ESTANDAR	Chi-Cuadrada	Pr > ChiCuadrada	Significancia
Región	1	-0.0824	0.0641	1.6498	0.1990	No Significativo
Muestreo	1	-0.0492	0.0892	0.3040	0.5814	No Significativo
Temperatura	1	-0.0153	0.0130	0.3800	0.2401	No Significativo
Grupo	1	-0.1500	0.0954	2.4748	0.1157	No Significativo

* = 0.05 ** = 0.01

CUADRO A1.4. Análisis de la respuesta a la proteína 4 de 63 kDa, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	G.L	ESTIMADOS	ERROR ESTANDAR	Chi-Cuadrada	Pr > ChiCuadrada	Significancia
Región	1	-0.0958	0.0678	1.9987	0.1574	No Significativo
Muestreo	1	-0.00112	0.0925	0.0001	0.9903	No Significativo
Temperatura	1	-0.0374	0.0137	7.4915	0.0062	Significativo **
Grupo	1	0.0223	0.1077	0.0430	0.8358	No Significativo

* = 0.05 ** = 0.01

DEPARTAMENTO DE
FALLA DE CALIDAD

CUADRO A1.5. Análisis de la respuesta a la proteína 5 de 53 kDa, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	G.L	ESTIMADOS	ERROR ESTANDAR	Chi-Cuadrada	Pr > ChiCuadrada	Significancia
Región	1	0.0896	0.0680	1.7349	0.1878	No Significativo
Muestreo	1	-0.1195	0.1012	1.3942	0.2377	No Significativo
Temperatura	1	-0.00739	0.0131	0.3172	0.5733	No Significativo
Grupo	1	0.2387	0.1030	5.3714	0.0205	Significativo **

* = 0.05 ** = 0.01

CUADRO A1.6. Análisis de la respuesta a la proteína 6 de 45 kDa, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	G.L	ESTIMADOS	ERROR ESTANDAR	Chi-Cuadrada	Pr > ChiCuadrada	Significancia
Región	1	-0.1406	0.0724	3.7664	0.2267	No Significativo
Muestreo	1	0.0257	0.1105	0.0539	0.0523	Significativo *
Temperatura	1	-0.0349	0.0140	6.2389	0.0125	Significativo **
Grupo	1	-0.0304	0.1002	0.0919	0.7618	No Significativo

* = 0.05 ** = 0.01

CEM
FALLA DE URGEN

CUADRO A1.7. Análisis de la respuesta a la proteína 7 de 35 kDa, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	G.L	ESTIMADOS	ERROR ESTANDAR	Chi-Cuadrada	Pr > ChiCuadrada	Significancia
Región	1	-0.4826	0.0832	33.6561	0.0001	Significativo **
Muestreo	1	0.2758	0.1020	7.3110	0.0069	Significativo **
Temperatura	1	-0.0440	0.0175	6.3104	0.0120	Significativo **
Grupo	1	-0.1799	0.1245	2.0874	0.1485	No Significativo

* = 0.05 ** = 0.01

CUADRO A1.8. Análisis de la respuesta a la proteína 8 de 27 kDa, contra las diferentes variables evaluadas en el trabajo de investigación.

PARÁMETRO	G.L	ESTIMADOS	ERROR ESTANDAR	Chi-Cuadrada	Pr > ChiCuadrada	Significancia
Región	1	-0.6467	0.1013	40.7689	0.0001	Significativo **
Muestreo	1	0.3012	0.1148	6.8856	0.0087	Significativo **
Temperatura	1	-0.0406	0.0164	6.1538	0.0131	Significativo **
Grupo	1	-0.6552	0.1718	14.5389	0.0001	Significativo **

* = 0.05 ** = 0.01

Trabajo de
FALLA DE ORIGEN

XII. LITERATURA CITADA.

1. Ayala, M.A., 1977, Incidencia y prevalencia de neumonías en becerros Holstein Friesian en etapa de lactancia y destete durante un año en un centro de cría. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. México D.F.
2. Murguía O. L., 1988. Mortalidad en corderos de razas tropicales del nacimiento al destete. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina. México. p.173
3. Velázquez, O.V., Navarrete, A.P. y Vera, C.H.E., 1987. Frecuencia de aislamientos de *Pasteurella haemolytica* y sensibilidad *in vitro* en cepas obtenidas de corderos de 0-90 días de edad en el valle de Toluca. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina. México. p. 180
4. Trigo, J.F. 1995. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos. Memorias del Seminario de Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, N.L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, N.L., México., 18-22
5. Gibbs, H. A., Allan, E. M., Wiseman, A. et al., 1984. Experimental production of bovine pneumonic pasteurellosis. Res. Vet. Sci., 37: 154-166.
6. Weekley, L. B., Veit, H. P., 1995. Potential morphologic and physiologic factors that may predispose the bovine lung to respiratory disease. Compend Contin Educ Prac Vet 17 (7): 974-983.
7. Babiuk, L. A., Lawman, M.J. P., Biol MI, et al., 1987. Bovine respiratory disease: pathogenesis and testigo by interferon. In : A Seminar in Bovine Immunology, Western States Veterinary Conference. Veterinary Learning Systems., 12-24.
8. Yates, W.D.G. 1982: A review of infectious bovine rhinotracheitis sheeping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can. J. Comp. Med. 46:225-263.

9. Laurance, O. W., Maheswaran, K. S., Douglas, J. W., Trevor, R. A., Mathur, S. K., 1992. *Pasteurella haemolytica* A1 and Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis. J. Vet. Inter. Med., 6: 11-22.
10. Dereck, A. M., Simons, K. R., Confer, A. W., Panciera, R.J. y Clinkenbeard, K. D., 1989. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infect. Immun., 57: 711
11. Aley, M.R. y Clarke, J.L., 1977. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. N. Z. Vet. J., 25:20
12. Biberstein, E.L., 1978. Biotyping and Serotyping of *Pasteurella haemolytica*. En: Bergan, T. y Norris, J., Methods in Microbiology. Acade. Press Inc. N. Y., 10:253
13. Merchant, I.A. y Pecker, A.A., 1994. Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Acriba, España, A.A. and Whitt, D.D. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Am. Sc. for Microbiol., Washington, D.C., 348.
14. Øystein A., Quirie M., Donachie W., Bisgaard M., 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. Danish Veterinary Laboratory, DK-1790 Copenhagen V. Vet. Microbiol., 65: 283-290.
15. Frank, G. H. and Wessman, G.E., 1978. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. J. Clin. Microbiol., 7: 142-145.
16. Sutherland, A.D. and Donachie, W., 1986. Cytotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet. Microbiol., 11: 331-336.
17. Sneath, P.H.A. and M. Stevens. 1990. *Actinobacillus rosii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov. and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:148-153.
18. Sutherland, A. D. and Redmond, J., 1986. Cytotoxin from ovine strain of *Pasteurella haemolytica*: Characterization studies and partial purification. Vet. Microbiol., 11: 33

19. Blanco, V. F. J., Trigo, T.F.J., Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Tapia, P.G. y Suárez, G. F., 1993. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet. Méx. 24: 107-112
20. Morales, A. J. F., Jaramillo, M. L., Oropeza, V. Z., Tórtora, P.J.L., Trigo, T. F. J. Y Espino, R. G; 1993. Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella hamolytica* en corderos. Vet. Méx. 24: 97-105.
21. Aguilar, T. C. y Tórtora, P. J., 1989. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F. Memorias del III Congreso Nacional de Producción Ovina. Tlaxcala, Tlaxcala, México. Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos, México, D.F.: 146-149
22. Lea-Master, B. R., Evermann, J. F. And Lehm kuhl, H. D., 1987. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootia of respiratory tract disease in recently weaned lambs. J. Am. Vet. Med., 190: 1545-1547.
23. López, A., Maxie, M.G., Savan, M., Ruhnke, H.L., Thomson, R. G., Barnum, D. A. and Geissinger, H. D., 1982. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with bovine virus diarrhea or *Mycoplasma bovis*. Can. J. Comp. Med., 46: 302-306.
24. Weekley, L.B., DVM,PhD., Tech, V. Veit,P.H., DVM, PhD., Eyre,P.,1998. Bovine Pneumonic Pasteurellosis. Part I Pathophysiology., 20, No. 1
25. Frank, G. H., Briggs, R. E., Loon, R. W., et. Al., 1994. Serotype specific inhibitor of colonization of the tonsils and nasopharynx of calves by *Pasteurella haemolytica* serotype 1 after vaccination with the organism. Am. J. Vet. Res., 8: 1107-1110.
26. Hamdy, A. H., Trapp, A. L., 1967. Investigation of nassal flora of feedlot calves before and after weaning. Am. J. Vet. Res., 28: 1019-1025.
27. Jones, C. D. R., 1987. Proliferation of *Pasteurella haemolytica* in the calf respiratory tract after and abrupt change in climate. Res. Vet. Sci., 42: 179-186.

28. Pardy, C. W., Scantan, C. M., Loan, R. W., Foster, G. S., 1993. Identification of *Pasteurella haemolytica* A1 isolated from market stressed feeder calves by use of enzyme and antimicrobial susceptibility profiles. Am. J. Vet. Res., 54: 179-186.
29. Briggs, R. E., Frank, G. H., 1992. Increased elastase activity in nasal mucus associated with nasal colonization by *Pasteurella haemolytica* in infectious bovine rhinotracheitis virus-infected calves. Am. J. Vet. Res., 53: 631-635.
30. Jericho, K. W. F., Lejeune, A., Tiffin, G. B., 1986. Bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica* aerobiology in experimentally infected calves. Am. J. Vet. Res., 47: 205-209.
31. Morales, A. J. F., 1994. Avances y perspectivas sobre inmunización contra la pasteurelosis neumónica en ovinos. Resúmenes del simposio de inmunología del aparato respiratorio., FESC-UNAM., 19-26.
32. Fillion L.G., et. Al., 1983. Nonspecific suppressive effect of bovine herpesvirus type I on bovine leucocyte functions. Infect. Immun., 42: 106-112.
33. Trigo F. J., 1983. El virus respiratorio sincitial bovino en las neumonías de bovinos y ovinos. Vet. Mex., 14: 175-179
34. Carrier P.D., et. al., 1983. Exposure of calves to aerosols of parainfluenza - 3 virus and *Pasteurella haemolytica*. Can. J. Comp. Med., 47: 422-432.
35. Trigo, F. J., 1992. Patología del Aparato Respiratorio. Patología Sistémica Veterinaria., 2ª Ed., Edit. Mc Graw Hill., Interamericana, México, D.F., pp 128.
36. Binkharst, G. J., Henricks, P. A. J., Ingh, T. S. G. A. M., Hajer, R. and Nijkamp. F. P. 1990. The effect of stress on host defense system on lung damage in calves experimentally infected with *Pasteurella haemolytica* type A1. J. Am. Vet. Med. Ass 37: 525-536
37. Gentry M.J., et. Al., 1985. Serum neutralization of cytotoxin from *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and resistance to experimental bovine pneumonic pasteurelosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 9: 239-250.

38. International Pasteurellaceae Society Conference., proceedings. Branff National Park, Canada., May 5-10. 2002.
39. Heddlestone, K.L., and Rebers, P.AQ., 1972. Fowl cholera: cross-immunity induced in turkeys with formalina filled in – vivo propagated *Pasteurella multocida* . Avian Dis. 16:578-586
40. Petras, S.F.; M. Chidambaram; E.F. Illyes; S. Froshauer and C.P. Reese. 1995. Antigenic and virulence properties of *Pasteurella haemolytica* leucotoxin mutants. Infect. Immun. 63: 1033-1039.
41. Chang.Y.F., Young, D. R.Y.,Post.D. and Struck.K.D. 1987. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. Infect. Immun. 55: 2348-2354.
42. Shewen,P.E., and Wilkie, B.N. 1985. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. Am. J. Vet. Res. 46: 1212-1214.
43. Welch, R.A. 1991. Pore-forming cytollisins of Gram-negative bacteria. Med. Microbiol. 5: 521-528.
44. Boehm,D.F., Welch. R.A. and Snyder,I.S. 1990. Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involvet in binding of calcium and erithrocyte membranes. Infec. Immun. 58: 1957-1964.
45. Gerbic, D.G.,Walker, R.D., Baker, J.C.,Foster,J.S., and Moore, R.N. 1989. Calcium ion involvement in the action of *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. Vet. Microbiol. 19: 325-335.
46. Ludwing, A., Hardchau, T., Benz, R., and Goebel, W. 1988. Repeat domain of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺ dependent binding to erithrocytes. Mol. Gen. Genet. 214: 553-561.
47. Bhakdi., S., Mackman., N., Gray.,L., and Holland., I.B. 1986. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. Infect. Immun. 52: 63-69.

48. Clinkenbeard., K.D., Mosier., D.A., and Confer., A. W. 1989. Transmembrane pore size and role of cel swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Immun.* 57: 420-425
49. Menestrina., G., Mackman., N., Holan., I.B., and Bhakdi., S. 1987. *Escherichia coli* hemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 905: 109-117.
50. Bhakdi., S., and Martin., E. 1991. Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* 59: 2955-2962.
51. Czuprynski., C.J., Noel., E.J., Ortiz-Carranza., O. and Srikumaran., S. 1991. Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Immun.* 59: 3126-3133.
52. Dom., P., Haesebrouck., F., Kamp., E.M., and Smits., M.A. 1994. NAD-independent *Actinobacillus pleuroneumoniae* strains: production of RTX toxins and interactions with porcine phagocytes. *Vet. Microbiol.* 39: 205-218.
53. Emert., L., Rousseau., S., Schutte., H., Birkemeyer., R.G., Grimminger., F., Bhakdi, S., Duncker, H. R., and Seeger., W. 1992. Induction of severe vascular leakage by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rabbit lungs. *Lab. Invest.* 66: 362-369.
54. Grimminger., F., Thomas., M., Oberritz, R., Walmrath, D., Bhakdi, S., and Seeger, W. 1990. Inflammatory lipid mediator generation elicited by viable hemolysin-forming *Escherichia coli* in lung vasculature. *J. Exp. Med.* 172: 1115-1125.
55. Konig, B., Konig, W., Scheffer, J., Hacker, J., and Goebel, W. 1986. Role of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells. *Infect. Immun.* 54: 886-892.
56. Konig, B., Ludwig, A., Goebel, W., and Konig, W. 1994. Pore formation by the *Escherichia coli* alpha-hemolysin: role for mediator release from human inflammatory cells. *Infect. Immun.* 62: 4611-4617.

57. Maheswaran, S.K., Weiss, D.J., Kannan, M.S., Townsend, E.L., Reddy, K.R., Whiteley, L.O., and Srikskumar, S., 1992. Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leucotoxin on bovine neutrophils: degranulation of generation of oxygen-derived free radicals. Vet. Immunol. Immunopathol. 33: 51-68.
58. Suttorp, N., Fuhrmann, M., Tannert-Otto, S., Grimminger, F., and Bhakdi, S. 1993. Pore-forming bacterial toxins potentially induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. J. Exp. Med. 178: 337-34.
59. Balayut, C.S., Simonson, R.R., Bemrick, J., Maheswaran, S.K. 1981. Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. Am. J. Vet. Res. 42: 1920-1926.
60. Himmel, M.E.; Yates, M.D.; Lauerman, L.H. and Squire, P.G. 1982. Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 43:764-767.
61. Kaehler, K.L.; Markham, R.J.F.; Muscoplat, C.C. and Johnson, D.W. 1980. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. Am. Vet. Res. 41: 1690-1693.
62. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N. 1982. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. Infect. Immun. 35:91-94.
63. Sutherland, A.D. 1985. Effects of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin on ovine peripheral blood leukocytes and lymphocytes obtained from gastric lymph. Vet. Microbiol. 10:431-438.
64. Ortiz-Carranza, O. and Czuprynsky, C.J. 1992. Activation of bovine neutrophils by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is calcium dependent. J. Leukocyte. Biol. 52:558-564.
65. Laurence, O., Whiteley, DVM, PhD, Samuel, K., Maheswaran, BVSc, PhD, Douglas J. Weiss, DVM, PhD, Trevor, R., Ames, DVM, MS, and Mathur, S., Kannan, BVSc, PhD., 1992. *Pasteurella haemolytica* A1 and Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis. J. Vet. I. Med.; 6:11-22.

66. Wang, Z.; Clarke, C. and Clinkenbeard, K. 1998. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A₂ activity in bovine neutrophils. *Infect. Immun.*, 66: 1885-1890.
67. Stevens, P.K. and Czuprynski. 1996. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis *in vitro*. *Infect. Immun.* 64: 2687-2694.
68. Shewen, P.E., and Wilkie, B.N. 1985. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1212-1214.
69. Burrows, L.L.; Olah-Winfield, E. And Lo, R.Y. 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect. Immun.* 61:5001-5007.
70. Hughes, H.P.A., Campos, M., Mc Dougall, L., Beskorwayne, T.K., Potter, A.A. and Babiuk, L.A. 1994. Regulation of major histocompatibility complex class II expression by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 62: 1609-1615
71. Henricks, P.A.J., Binhorst, G.J., Druver, A.A. and NukAMP. 1992. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B₄ and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclearleukocytes. *Infect. Immun.* 60: 3238-3243
72. Whiteley, L.O., Maheswaran, S. K., Weiss, D. J. and Ames, T.R. 1990. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1 derived endotoxin, leukotoxin and polysaccharide in experimental bovine *Pasteurella* pneumonia. *Vet. Pathol.* 27: 150-161
73. Hughes, H.P., Campos, M., Mcdougall, L., Beskorwaine, T.K., Potte, A.A. and Bibiuk, L. A., 1994. Regulation of mayor histocompatibility complex class II expression by *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Immun.*, 5: 1609-1615.
74. Shewen PE, Wilkie BN. 1988. Vaccination of calves whit leucotoxin culture supernatan from *Pasteurella haemolytica* . *Can J Vet Res.*, 52:30-36
75. Abdullah, K. M., Lo, Y. C. R. and Mellors, A., 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. *J. Bacteriol.* 173: 5597-5603.

76. Abdullah, K. M., Udoh, E. A., Shewen, P. E. and Mellors, A., 1992. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. *Infect. Immun.*, 60: 56-62
77. Otulakowski, G. L., Shewe, P.E., Udho, A.E., Mellors, A. And Wilkie, B.N., 1983. Proteolysis of sialoglycoprotein by *Pasteurella haemolytica* cytotoxin culture supernatant. *Infect. Immun.*, 42: 64-70.
78. Frank, G. H. and Tabatabai, L. P., 1981. Neuraminidase activity of *Pasteurella haemolytica* isolates. *Infect. Immun.*, 32: 1119-1122.
79. Shewen, P. E., Sharpe, A. and Wilkie, B. N., 1988. Efficacy testing a *Pasteurella haemolytica* extract vaccine. *Vet. Med.*, 10: 1078-1083.
80. Severn, W.B., Johnston, R.A.Z., Leitch, R.A. and Richards, J.C. 1992. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella haemolytica* serotype A1. *Glycobiology* 2: 463
81. Breider, M. A., Kumar, S. and Corstvet, R.E. 1990. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. *Infect. Immun.* 58: 1671-1677
82. Brogden, K.A., DeBey, B. and Cutlip, R. 1995. Lesions induced *in vivo* by cell associated products of *Pasteurella haemolytica* and their role in the pathogenesis of bovine respiratory disease. *Memorias del Seminarios de Pasteurelosis Neumónica del Ganado Bovino*. Monterrey, N.L., México 23-29. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México.
83. Breider, M. A., Kumar, S. and Corstvet, R.E. 1991. Interaction of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated damage to pulmonary endothelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27: 337-350.
84. Fenwick, B.W. 1990. Virulence attributes of the lipopolysaccharides of the HAP group organisms. *Can. J. Vet. Res.* 54: 528-532.
85. Paulsen, D.B., Confer, A.W., Clinkenbeard, K.D. and Moiser, D.A. 1990. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from and neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1635-1639.

86. Sharma, S.A., Olchoway, T. W.J. and Breider, M.A. 1992. Alveolar macrophage and neutrophil interactions in *Pasteurella haemolytica* induced endothelial cell injury. J. Infect. Dis. 165:651.
87. Yoo, H. S., Maheswaran, S. K., Lin, G., Townsend, E.L. and Ames, T.R. 1995. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolisaccharide. Infect. Immun. 63: 381-388.
88. Lacroix, R.P., Duncan, R.J., Jenkins, R.P., Leitch, R.A., Perry, J.A. and Richards, J. C. 1993. Structural and serological specificities of *Pasteurella haemolytica* lipopolisaccharides. Infect. Immun. 61: 170-181.
89. Brogden, K.A., Adlam, C., Lehmkuhl, H.D. and Cutlip, R.C. 1989. Effect of *Pasteurella haemolytica* (A1) capsular polysaccharide on sheep lung *in vivo* and on pulmonary surfactant *in vitro*. Am. J. Vet. Res. 50: 555-559.
90. Davies, R. L., Ali, Q., Parton, R., Coote, J.G., Gibbs, A. and Freer, J. H., 1991. Optimal conditions for the analysis of *Pasteurella haemolytica* lipopolisaccharide by sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* 90: 23-29.
91. Yoo, H.S., Rajagopal, B.S., Maheswaran, S.K., Srinand, S. and Ames, T.R. 1995. Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxine induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. Microb. Pathog. 18: 237-242.
92. Frank, G.H. 1982. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the midwestern United States. Am. J. Vet. Res. 43:2035-2037.
93. Lacroix, R.P.J.R.; Duncan, R.P.; Jenkins, R.A.; Leitch, J.A.; Perry and J.C. Richards. 1993. Structural and serological specificities of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharides. Infect. Immun. 61:170-181.
94. Purdy, C. W., Straus, D. C., Struck, D., et al., 1993. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasterellosis. An. J. Vet. Res., 54:1637-1647.

95. Conton, J. A., Shewen, P. E., Lo, R. Y. C., 1991. Efficacy of recombinant leucotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.*, 59:587-591.
96. Kimura, A., Gulig, P. A., McCracken, G. H. Jr., et. al., 1985. A minor high-molecular weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. *Infect. Immun.*, 47: 253-259.
97. Gulig, P. A., McCracken, G. H. Jr, Frish, C. F., et al. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. *Infect. Immun.*, 37: 82-88.
98. Squire, P.G., Smiley, D.W., Croskell, R.B., 1984. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect. Immun.*; 45: 667-673.
99. Iovane G., Galdiero M., Vietello M., De Martino L., 1998. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins of bovine neutrophils. *FEMS, Immunol Med. Microbiol.*, 1:29-36
100. Donachie, W., 1996. Vaccines against *Pasteurella*. *World Association of Microbiologists Immunologists and Specialists in Infection Disease 14th International Symposium, Edinburgh. Annual Scientific Report, 1997.*
101. Kyd, J.M., Taylor, D., Cripps AW., 1994. Conservation of immune responses to proteins isolated by preparative polyacrylamide gel electrophoresis from the outer membrane of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.*; 62: 5652-5658.
102. Pandher K, Murphy, G.L., 1996. Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.*; 51: 331-334.
103. Confer, A.W., Panciera, R.J., 1994. Testing of two new generation *Pasteurella haemolytica* vaccines against experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Agri-Pract.*; 15: 10-15.

104. Morton, R.J., Panciera, R.J., Fulton, R.W., et al., 1995. Vaccination of cattle with outer membrane -protein-enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. Am. J. Vet. Res; 56: 875-879.
105. Confer, A.W., McCraw, R.D., Durham, J.A. et al., 1995. Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. Vet. Immunol Immunopathol; 47: 101-110.
106. Morton, R. J., Confer, A. W., Mosier, D. A. and Simons, K. R., 1994. Outer Membrane Protein antigens of *Pasteurella haemolytica* associate with resistance to pneumonic pasteurellosis. Annu. Meet. Conf. Res. Work. Anim. Dis.
107. Karamjeet, P., Murphy, L., G., 1996. Genetic and immunological analyses of a 38kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. Veterinary Microbiology., 51: 331-341.
108. Donachie, W y Gilmur, N. J. L., 1988: Sheep antibody response to cell wall antigens expressed *in vivo* by *Pasteurella haemolytica* serotype A2, FEMS Microbiol Lett., 56: 271-276
109. Davies, R.L., Arkinsaw, S. and Selander, R.K., 1997. Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep. Infect. Immun. 65: 3585-3593
110. Rimler, R.B., 1994: Partial purification of cross-protective factor(s) from *Pasteurella multocida* . Avian Dis. 38: 778-789.
111. Rimler, R.B. and Rhoades., 1989. Solubilization of membrane-associated cross-protective factors(s) of *Pasteurella multocida*. Avian Dis. 33:258-263.
112. Ramdani and Alder, B., 1991: Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of *Pasteurella multocida* and the role of LPS immunity. Vet. Microbiol. 26: 335-347.
113. Cowan, S. T. and Steel's, K. J., 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Compañía Editorial Continental S.A. México.

114. Gentry, M.L., Confer, A.W. y Kreps, J.A., 1985. Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. J. Clin. Microbiol; 22:968.
115. Squire PG, Smiley DW, Croskell RB., 1984. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. Infec Immun., 45: 667-673
116. Riezu-Boj, J. I., Moriyon, I., Blasco, J. M. Gamazo, C. and Diaz, R., 1986. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. Infect. Immun. 58: 489-494
117. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. Anal Biochemistry 72: 248-254.
118. Laemmli, W.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 227:680-685.
119. Dabo, S. M., Styre, D., Confer, A. W. and Murphy, G. L., 1994. Expression, purification and immunologic analysis of *Pasteurella haemolytica* A1 28-30 kDa lipoproteins. Microbiol. Pathogen., 17:149-158
120. Toubin, H. and Gordon, J., 1984. Immunoblotting and dot immunoblot. Current. Estatus and Out Luck. J. Immunol. Method. 72: 313
121. Blood, D.C and Radostits, O. M., 1992. Medicina Veterinaria. Interamericana McGraw-Hill, 7ª edic. 1: 45-49
122. Cravens R, M.S., D.V.M., 1996. Comparative Evaluation of the Immunological Response to Virulence Factors of *Pasteurella haemolytica*. Technical Bulletin., Pfizer Animal Health.
123. Cravens R. C, Confer AW, Gentry MJ., 1991. Cloning and expression of a 30 kDa surface antigen of *Pasteurella haemolytica*. Vet. Microbiol., 27: 63-78.

124. Knights JM, Adlam C, Owe P., 1990. Characterization of envelop proteins from *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. J. Gen Microbiol., 136: 495-505
125. Moiser DA, Simons KR, Confer AW, et al. 1987. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infec Immun., 57:711-716
126. Confer, W.A. and Durham, J. A.. 1992. Sequential development of antigens and toxins of *Pasteurella haemolytica* of serotype 1 grow in cell culture medium. Am. J. Vet. Res. 53: 646-652
127. González, R. C., Morales, A. J. F., Tenorio, G. R. V., Cuellar, O. J. A., 1997. Aislamiento y caracterización parcial de *Pasteurella sp.* de cuadros neumónicos en bovinos y ovinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
128. Rossmanith, R. E. S., Wilt, G. R., Gin, W., 1991. Characterization and comparison of antimicrobial susceptibilities and outer membrane protein and plasmid DNA profiles of *Pasteurella haemolytica* and certain other members of the genus *Pasteurella*. Am. J. Vet. Res., 12: 2016-2021.
129. Gilleland H.E., et. al., 1987. Perspectives on the potential for successful development of outer membrane protein vaccines. Eur. J. Clin. Microbiol., 6: 231-233.
130. Confer, A. W., Durham, J. A., Clarke, C. R., 1992. Comparison of antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1, grown *in vitro* and *in vivo*. Am. J. Vet. Res., 53: 472-476.
131. Confer A W, Panciera R J, Moiser D A., 1988. Bovine pneumonic pasteurellosis: immunity to *Pasteurella haemolytica*. J Am Vet Med Assoc., 193: 1308-1316.
132. Gentry MJ, Confer AW, Panciera RJ., 1985. Serum neutralization of cytotoxin from *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Vet Immunol Immunopathol., 9:239-250.
133. Moiser DA, Simons KR, Confer AW, et al. 1987. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infec Immune., 57: 711.716

134. Confer AW, Panciera RJ, Gentry MJ, et al., 1986. Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. Am J Vet Res., 47: 1853-1857.
135. Moiser DA, Confer AW, Panciera RJ., 1989. The evolution of vaccines for pneumonic pasteurellosis. Res Vet Sci.. 47: 1-11
136. Morton, J. R., Simons, K. R. and Confer, W. A., 1996. Major outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serovar 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. Vet. Microbiol. 51: 319-330