



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**RESPUESTA SEROLÓGICA A CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN  
EXPERIMENTAL UTILIZADOS PARA PREVENIR LA PASTEURELOSIS  
NEUMÓNICA EN OVINOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTAN:**

**ORTEGA FLORES DIANA**

**TOVAR LIMÓN GUADALUPE VICTORIA**

**ASESORES:**

**DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ALVAREZ.**

**M.C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **De: Guadalupe Tovar**

### **A mí querida madre**

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante, sólo deseo que comprendas que mi logro es tuyo.

### **A mis hermanas y hermano:**

Por que siempre estuvieron a mi lado como testigos de mis sueños y desvelos, de mis triunfos y fracasos y por además ser unos buenos amigos.

### **A Misael**

En correspondencia a tanto amor, dedicación, paciencia y confianza, por tú fe en mí y por el aliento que me das para llegar hasta el fin.

### **Al Dr. Morales**

Por depositar en mí su confianza, cariño, apoyo, dedicación, respeto y por brindarme su amistad en cada momento que lo necesite.

### **Al Dr. Alfredo Cuellar**

Por el apoyo incondicional como asesor, como amigo y sobretodo por la alegría que muestra cada día.

### **Al Dr. Enrique Esperón**

Por que en usted encontré un gran amigo y sobretodo un excelente profesor que merece mi admiración y respeto.

### **Al Dr. Benito López Baños**

Por ser tan amable y por brindarme todo su apoyo y dedicación en este trabajo, por darme consejos y por tener en usted un gran amigo.

### **Al Dr. Flores y al Dr. Dionisio**

Por brindarme su amistad sin conocerme y por la dedicación que tuvieron al escucharme.

### **A mis sobrinos, amigas y amigos**

Por todas las veces que me hicieron sonreír y por brindarme su amistad sin recibir nada a cambio. A mis pequeños para darles el mejor ejemplo.

## **A todos los que en mí confiaron**

### **De la esperanza**

Entremos aquí con la esperanza.

El júbilo del día que vendrá

os germina en los ojos como una luz reciente.

Pero ese día que vendrá no ha de venir: es esté.

Jaime Sabines.

## AGRADECIMIENTOS DIANA

GRACIAS DIOS por haberme prestado vida, salud y bienestar, para que hoy vea todo lo que he conseguido en mi vida profesional.

GRACIAS A TI LUPITA mi amiga, por haberme apoyado y compartir esto conmigo, que para las dos es muy importante, y que mejor que compartirlo con alguien como tú.

A MIS PADRES; RAUL Y EUFEMIA  
No tengo palabras para agradecer y demostrar toda mi admiración hacia ustedes, pues hoy no solo es mi sueño hecho realidad también es suyo, y así lo quiero compartir.

A ENRIQUE RUIZ MANRIQUE el hombre mas comprensible, al amigo que estuvo conmigo apoyándome, quien siempre me hace ver que soy capaz de realizar muchas cosas, y sobre todo a la pareja tan maravillosa que eres y por el amor que me brindas.  
GRACIAS AMOR.

A MIS HERMANOS RAUL Y EDITH  
Gracias hermanito porque tu ayuda, consejos y algunos regaños que de niña tuve de tu parte, he podido concluir este sueño que hoy quiero compartir contigo. También gracias por darme una hermana como lo es Edith, que entre los dos nos han dado un hermoso regalo que es un angelito llamada Catherine, mi princesa.

A EL Dr. MORALES que además de ser un buen maestro, es un buen amigo que brinda su apoyo y conocimientos a nosotros sus alumnos, y disculpe si en algún momento fui causante de sus canas, pero sabe que lo aprecio mucho.

## INDICE

Resumen .....	1
Introducción .....	2
a) Antecedentes .....	2
b) Mecanismos de defensa .....	4
c) Factores de virulencia .....	8
d) Patogenia .....	11
e) Prevención .....	14
Justificación .....	17
Hipótesis .....	17
Objetivos .....	18
Material y Métodos .....	19
a) Calendario de inmunización .....	25
b) Determinación de anticuerpos contra antígenos capsulares .....	26
c) Obtención de leucotoxina para la prueba de ensayo visual simple .....	26
d) Choque hipotónico para la obtención de leucocitos.....	27
e) Determinación del título de la leucotoxina .....	27
f) Determinación de anticuerpos contra la leucotoxina de <i>Mannheimia</i> <i>haemolytica</i> por medio de la prueba de ensayo visual simple .....	28
g) Análisis estadístico .....	29
h) caracterización bioquímica de las cepas de <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	29
Resultados .....	31
Discusión .....	44
Conclusiones .....	47
Literatura citada .....	48

## RESUMEN

*Mannheimia haemolytica*, antes conocida como *Pasteurella haemolytica* es uno de los principales patógenos asociados a problemas neumónicos en rumiantes. Se han reconocido, por hemoaglutinación indirecta, 17 serotipos de acuerdo a antígenos capsulares solubles, siendo los más importantes A1 y A2, además de la leucotoxina; la cual es tóxica para macrófagos y leucocitos.

El objetivo fue evaluar la respuesta serológica a la aplicación de cuatro biológicos comerciales y uno experimental, los cuales son utilizados para la prevención de la Pasteurelisis neumónica en ovinos, para lo cual se utilizaron 180 ovinos criollos de 2 a 4 meses de edad, los cuales se distribuyeron de manera aleatoria en 6 grupos de 30 ovinos cada uno.

Utilizando un inmunógeno experimental denominado "A" el cual contiene bacterias muertas formalinizadas de *M. haemolytica*, serotipo A1 y A2 y que además contiene un sobrenadante de cultivo rico en leucotoxina y 4 inmunógenos comerciales los cuales fueron designados como "B", "C", "D" y "E", además del grupo control denominado "F".

La inmunización se realizó el día 0 y la revacunación 15 días después, tomando muestras de sangre los días 0 (toma basal), 15, 30 y 45. La determinación de anticuerpos contra antígenos capsulares se realizó por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación y la determinación de anticuerpos contra la leucotoxina por medio de la prueba de ensayo visual simple.

De manera general en los resultados, se puede observar una mejor respuesta en los biológicos contra el serotipo A1 comparado con la respuesta de los serotipos A2 y la Leucotoxina, donde la mejor respuesta entre biológicos corresponde al biológico A.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias de los rumiantes representan una de las causas importantes de pérdidas económicas para la ganadería nacional; ya que afecta directamente al proceso productivo de las explotaciones comerciales incidiendo de manera importante en la economía del productor, así como del país.<sup>33, 38, 39, 49</sup>

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.<sup>3, 49</sup> En México como en el extranjero los estudios realizados sobre mortalidad de corderos han determinado que la muerte asociada a neumonías puede rebasar el 20%.<sup>39, 47, 49</sup> 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.<sup>2, 3, 39</sup>

### A) ANTECEDENTES

*Mannheimia haemolytica*, antes conocida como *Pasteurella haemolytica* es uno de los principales patógenos asociados a problemas neumónicos en rumiantes. Entre las características generales de *M. haemolytica* se puede mencionar que es una bacteria de forma cocobacilar que mide de 1.4 x 0.4µm, es Gram negativa, presenta una coloración bipolar la cual es mas manifiesta con la tinción Wright, es anaerobia facultativa, inmóvil, no forma spora, posee cápsula y es oxidasa positiva. La mayoría de las cepas fermentan los carbohidratos, producen una pequeña cantidad de ácido pero no gas, no fermentan lactosa o lo hace débilmente, son negativos a las pruebas de rojo de metilo y el porcentaje de guanina-citocina en su DNA se encuentra entre 40-45 mol %.<sup>4, 5, 11, 44</sup>

En agar sangre sus colonias son grisáceas, lisas, de apariencia mucóide, por lo general miden entre 2 y 3 mm de diámetro, el crecimiento es aparente entre las 24 y 48 horas de incubación, es poco  $\beta$ -hemolítica e indol negativo.<sup>4, 5, 11, 44</sup>

Se han reconocido, por hemoaglutinación indirecta, 17 serotipos de acuerdo a antígenos capsulares solubles. La Pasteurelosis en rumiantes se presenta principalmente en dos formas: la neumónica, causada por *P. haemolytica* biotipo A y la generalizada producida por el biotipo T. Los biotipos A y T son diferenciados por su capacidad de fermentar arabinosa o trealosa respectivamente. En la nomenclatura actual los biotipos A fueron cambiados al género *Mannheimia*, este género contiene ahora cinco especies, *Mannheimia haemolytica*, donde se encuentran la mayoría de las cepas de referencia del Biotipo A, *M. glucosida* que incluye al serotipo A11; *M. granulomatis*, aislada de ganado bovino; *M. ruminalis*, que contiene cepas no hemolíticas aisladas del rumen de ganado bovino y ovino y *M. varigena* aislada de bovinos y porcinos, y los del biotipo T quedaron como *Pasteurella trehalosi*. Dentro del biotipo A se incluyen los siguientes serotipos A1, A2, A5-A9, A11-A14, A16, A17 y en el biotipo T los serotipos T3, T4, T10, T15. Se han reconocido 17 serotipos como patógenos para ovinos, los cuales representan el 90% de los aislamientos. De lo cuales el serotipo más importante es el A2 representando un 33% de todos los muestreos, sin embargo, el otro 10% permanece como no tipificable y se duda de su patogenicidad.<sup>4, 9, 38, 44, 46, 48</sup>

Existe en la cavidad nasal un porcentaje (7-10%) de *Mannheimia haemolytica*, el cuál se considera, aceptable como parte de la microbiota normal de la cavidad.<sup>19, 35</sup>

La patogénesis de la enfermedad es poco clara, ya que los mecanismos que permiten a la bacteria establecerse y diseminarse durante una infección no están completamente estudiados.<sup>10, 45</sup>

Varios productos bacterianos de *Mannheimia haemolytica* se consideran importantes en la inducción del daño al tejido pulmonar, dentro de éstos la cápsula, el lipopolisacárido (LPS) y la leucotoxina son los mejor estudiados. Otros factores de virulencia cuyo papel en la patogénesis no está bien documentado incluyen: proteínas de membrana externa, proteínas reguladas por hierro, glicocálix, fimbrias y enzimas como la neuraminidasa y sialoglicoproteasa neutra.<sup>7, 12, 22, 23, 51, 53</sup>

## **B) MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR**

Existen diferentes tipos de inmunidad los cuales se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Inmunidad activa: proceso mediante el cual los organismos producen sus propios anticuerpos, generándose, por lo tanto, memoria inmunológica.
- Inmunidad pasiva: es aquella en la que reciben anticuerpos preformados en otro organismo. Ambos tipos de inmunidad se subdividen en natural y artificial.
- Inmunidad activa natural: se genera como consecuencia de una infección o enfermedad.
- Inmunidad activa artificial: se induce a través de la aplicación de inmunógenos (vacunas, bacterinas, toxoides).
- Inmunidad pasiva natural: se adquiere ya sea en el útero a través del paso transplacentario de IgG maternas o posterior al nacimiento mediante la ingestión de calostro.
- Inmunidad pasiva artificial: se adquiere mediante la aplicación de un suero o globulinas hiperinmunes, provenientes de un animal que ha tenido repetidos contactos con una antígeno en particular.<sup>36</sup>

La respuesta inmune se caracteriza por ser específica, inducida y con memoria; no obstante, los organismos cuentan con mecanismos de defensa inespecíficos conocidos como resistencia o inmunidad innata.<sup>8, 23, 36</sup>

Los mecanismos inespecíficos se pueden dividir en tres niveles: tisular, celular y molecular.

- A nivel tisular: se refiere al mantenimiento de la integridad del organismo, piel y mucosas principalmente; ya que la mayoría de los microorganismos son incapaces de penetrar piel intacta.

Las mucosas atrapan en sus secreciones partículas extrañas incluyendo microorganismos, donde el epitelio mucociliar de algunas mucosas (nasal, traquea y bronquios, etc.), están en constante movimiento desplazando la partículas retenidas hacia la orofaringe para ser deglutidas.<sup>21, 36</sup> Además, tenemos la generación de turbulencias de aire en la cavidad nasal, la tos y el estornudo. Las partículas con diámetros comprendidos entre 0.5 y 2 micras, tamaño al cual corresponden la mayoría de las bacterias, pueden franquear los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del aparato respiratorio superior y logran llegar hasta la unión bronquioalveolar y la pared del alvéolo.<sup>8, 15, 24, 25, 34</sup>

- A nivel celular: la reacción inflamatoria es un elemento central que se explica como el resultado de un daño tisular que induce la liberación de una serie de moléculas (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas) cuyo efecto es la vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y quimiotaxis para leucocitos; estos cambios traen como consecuencia la salida de células sanguíneas (granulocitos, monocitos y linfocitos) y proteínas plasmáticas (complemento e inmunoglobulinas) que en su conjunto participan en el ataque contra los patógenos.

La fagocitosis es una función realizada por dos tipos de células neutrófilos y monocitos y/o macrófagos; donde la principal función es la destrucción del patógeno fagocitado.<sup>8, 21, 36</sup> Las células con actividad fagocítica representan la primera línea de defensa celular contra *Mannheimia haemolytica*, pero como resultado de un comensalismo evolutivo, la bacteria ha desarrollado estrategias que le permiten evitar los efectos antibacterianos de éstas células; uno de estos mecanismos es la liberación de una exotoxina o leucotoxina.<sup>15, 29, 31, 38, 50</sup> La citotoxicidad celular que se define como un fenómeno en el cual una célula del organismo denominada “célula blanco”, es destruida por otra célula de propio organismo denominada “célula efectora”.<sup>21, 36, 42</sup>

- A nivel molecular: el complemento que es una familia de proteínas plasmáticas que se designan con la letra C y números progresivos C1 a C9, que en condiciones normales se encuentran inactivas, sin embargo pueden ser activadas por dos vías, la vía clásica que se inicia por una reacción antígeno – anticuerpo y por la vía alterna que puede ser activada por diversos factores entre los que sobresale el LPS de bacterias Gram (-), a partir de la activación se da una reacción en cascada en la que una fracción activa a la siguiente y así sucesivamente hasta llegar al C9, la función del complemento es amplificar la reacción inflamatoria (donde C3 y C5 también conocidas como anafilotoxinas, producen degranulación de células cebadas con la consecuente liberación de histamina, provocando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular), amplificar la fagocitosis (donde C5 actúa como factor quimiotáctico que atrae fagocitos) y provocar lisis celular (por medio de las últimas fracciones C7, C8 y C9, las cuales adquieren forma tubular y se insertan en la membrana citoplasmática produciendo perforaciones que conducen a la lisis).<sup>15, 24, 25, 26, 29, 36</sup>

Las defensinas que son pequeños péptidos producidos por neutrófilos y monocitos y / o macrófagos y que actúan perforando las membranas de bacterias tanto Gram (+) como Gram (-).<sup>15, 24, 25, 26, 29, 36</sup>

La respuesta inmune posee tres características fundamentales: inducibilidad (para que se desarrolle la respuesta el organismo debe ser estimulado antígenicamente de forma natural, por infecciones o artificialmente mediante el uso de inmunógenos), especificidad (la respuesta es específica contra el antígeno que le dio origen) y memoria (implica que el sistema inmune del organismo recuerda el contacto previo con un antígeno de manera que en un segundo encuentro con el mismo antígeno responde aceleradamente).<sup>21,36</sup>

El tiempo transcurrido desde la inoculación del antígeno hasta la presencia de anticuerpos en suero (periodo de latencia) suele ser entre siete y diez días aproximadamente, después de este lapso la concentración de anticuerpos séricos aumenta hasta llegar a un máximo alrededor del día 21 y a partir de este momento empieza a declinar. Existen excepciones a esto último como por ejemplo infecciones subclínicas persistentes.<sup>36</sup>

Cuando el organismo es estimulado por segunda vez o sucesivas ocasiones con el mismo antígeno se presenta la respuesta secundaria, que se caracteriza por la reducción del periodo de latencia a tres días aproximadamente y una elevación rápida de los niveles de anticuerpos sericos. Esta característica de la respuesta inmune explica por que la mayoría de las enfermedades infecciosas se padecen una sola vez, asimismo esta propiedad es un objetivo fundamental de la inmunización, consistente en generar memoria inmunológica a través de la inoculación de microorganismos o sus antígenos.<sup>36</sup>

## E) FACTORES DE VIRULENCIA

Uno de los factores de virulencia principales es la leucotoxina la cual se produce en fase logarítmica de crecimiento de la bacteria, que altera y destruye a los diferentes tipos de leucocitos, como macrófagos alveolares, monocitos, neutrófilos, linfocitos, células cebadas y plaquetas.<sup>6, 11, 12, 46</sup>

La leucotoxina es una citolisina formadora de poros que pertenece a la familia de toxinas RTX. Tiene un peso molecular de 105 kDa y es común a todos los serotipos de *M. haemolytica*. Esta toxina daña a la célula insertándose a la membrana formando poros transmembranales, lo que provoca la salida de potasio (intracelular) e incorporación de calcio (extracelular), con el subsecuente hinchamiento y lisis celular.<sup>6, 11, 12, 26, 46</sup>

La leucotoxina posee especificidad por los leucocitos de rumiante sugiriendo que debe existir un receptor, presente únicamente en la superficie de la membrana de estas células a diferencia de otras citolisinas que exhiben actividades semejantes.<sup>9</sup>

La lisis y degranulación de los neutrófilos por la leucotoxina se considera como la causa primaria del proceso inflamatorio agudo característico de las pasteurelosis neumónica, debido a la liberación de mediadores inflamatorios como leucotrienos e histamina.<sup>6, 11, 28, 46</sup>

Estudios realizados *in vitro* ponen de manifiesto que la leucotoxina además de su efecto citotóxico sobre neutrófilos de bovino, también estimula el estallido respiratorio y la consecuente degranulación de los lisosomas, estos eventos son evidentes por la generación de radicales libres, como: el anión superóxido (O<sup>-</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La liberación de estos radicales de oxígeno, es un evento inmediato, mientras que la citolisis y liberación de proteasas por la degranulación ocurre posteriormente; estos cambios amplifican la respuesta inflamatoria, que dan como resultado lesiones más severas.<sup>6, 31</sup>

Los diferentes serotipos de *Mannheimia haemolytica* producen leucotoxinas de tamaño similar a la del serotipo A1, y son reconocidas al utilizar antisueros policlonales contra la leucotoxina de dicho serotipo en análisis de inmunotransferencia, indicando con ello que están inmunológicamente relacionadas.<sup>9</sup>

El lipopolisácarido (LPS) de *Mannheimia haemolytica* A1 comprende del 10-25% del peso seco de la bacteria y es uno de los componentes de la bacteria; con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria; las lesiones que induce dependen en gran medida del curso que presente la enfermedad y constan de grandes áreas de hiperemia y edema que abarcan el área de deposición y parte de los lóbulos adyacentes, pueden observarse también áreas de hemorragia y adhesiones fibrosas.<sup>51, 53</sup>

La cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis y de la actividad bactericida mediada por el complemento; una posible explicación a este último fenómeno es que el material capsular forma una barrera entre el complejo de ataque a la membrana, formado por los componentes del complemento de C5 hasta C9, y la superficie bacteriana, previniendo el efecto lítico, aún en presencia de anticuerpos; Sin embargo, la presencia de anticuerpos específicos al material capsular facilitan la fagocitosis de la bacteria y pueden ser de particular importancia en la resistencia a la pasteurelosis.<sup>22, 23, 37</sup>

La diversidad estructural y consecuente de las características antigénicas de los polisacáridos capsulares, puede estar relacionada con la especificidad al hospedero; así como, por diferencias en el potencial patogénico que se ha demostrado entre cepas y la modificación de la respuesta inmune conferida por las vacunas.<sup>28, 51</sup>

En la actualidad, a pesar de que se conocen algunos de los principales mecanismos de virulencia de *Mannheimia haemolytica*, se desconoce que estructuras le permiten colonizar el aparato respiratorio y ejercer sus efectos patogénicos.<sup>10</sup> Morck y cols. (1988), sugieren que la colonización de los alvéolos pulmonares por *Mannheimia haemolytica* es una importante etapa inicial en la patogénesis de la pasteurelisis en la que puede estar involucrada el glicocálix capsular y/o fimbrias. Estas estructuras se identificaron en *M. haemolytica* serotipo A1 por estudios de microscopía electrónica de bacterias aisladas y mantenidas en condiciones *in vitro*, como en bacterias identificadas en el fluido bronquioalveolar de animales experimentalmente infectados, en los cuales se observan estructuras fimbriales adheridas al epitelio de la tráquea.<sup>42</sup>

Estas observaciones apoyan la sugerencia de Morck sobre la posible participación de las fimbrias en la colonización del aparato respiratorio alto; curiosamente el glicocálix bacteriano o material de superficie de esta bacteria es mayor en la fase de crecimiento logarítmico, al igual que la producción de leucotoxina, sugiriéndose que esta estructura podría participar en la adherencia de la bacteria a los leucocitos y ejercer su efecto citolítico. Sin embargo, esto último no está demostrado.<sup>16, 27, 42</sup>

Dentro de los exoproductos de la bacteria se ha identificado y caracterizado una neuraminidasa, el papel sugerido para esta enzima es la remoción de las glicoproteínas de la superficie celular o del moco, facilitando la adherencia de ciertos microorganismos.

En un estudio sobre la producción de esta enzima en los diferentes serotipos de *Mannheimia* mostró que solo el serotipo 11 no la produce.<sup>3, 27, 46, 48</sup>

Además de la neuraminidasa, la bacteria secreta una glicoproteasa, donde un estudio sobre la distribución de esta enzima entre los diferentes serotipos reveló que todos los serotipos del biotipo A pertenecientes al género *Mannheimia* contienen el gen *gcp* que la codifica, a excepción del serotipo 11, que mostró una organización genética diferente y no presenta actividad proteolítica. El biotipo T del género *P. trehalosi* carece del gen y de actividad proteolítica; esto último puede tener relevancia en la patogenicidad diferencial entre ambos biotipos. Aparentemente existe relación entre su capacidad de inducir neumonía y la cantidad de producción de las enzimas.<sup>27, 46, 48</sup>

## **E) PATOGENIA**

Como parte de la microbiota normal de vías respiratorias altas *M. haemolytica* puede aislarse de individuos clínicamente sanos; ya que las bacterias de este género son comensales de las mucosas del aparato respiratorio alto de los rumiantes, donde pueden permanecer sin causar daño. Esta colonización inofensiva resulta de un equilibrio entre el crecimiento bacteriano y la respuesta del hospedero.<sup>1, 19, 24, 38, 45, 47</sup>

Estudios experimentales, han demostrado que las bacterias de la microbiota, son constantemente acarreadas al pulmón a través del aire inspirado. A pesar de esto, el pulmón permanece estéril gracias a sus eficientes mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, pero bajo situaciones que alteran los mecanismos de defensa pulmonares del hospedero logran establecerse en el aparato respiratorio bajo y romper este equilibrio, causando daño al tejido pulmonar.<sup>1, 7, 8, 10, 17, 19, 25, 34, 43, 45</sup>

Se menciona que factores predisponentes desempeñan una función determinante en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo: las condiciones medio ambientales adversas, mala alimentación y agentes primarios de tipo viral (adenovirus, virus respiratorio sincitial, parainfluenza 3, entre otros), parasitario (estrosis) pueden favorecer la presencia de estrés, baja de defensas inmunitarias y como consecuencia la presentación de Pasteurelisis neumónica donde *Mannheimia haemolytica* logra establecerse en el aparato respiratorio.<sup>2, 15, 30, 39, 43, 49, 50</sup>

Debido a que en la presentación de la enfermedad intervienen diversos factores y pueden estar involucrados varios agentes infecciosos, la enfermedad fue propiamente denominada como Complejo Respiratorio.<sup>2, 17, 30, 38, 43, 49, 50</sup>

La neumonía causada por *M. haemolytica* en estudios experimentales, se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa aguda o sobreaguda que puede manifestarse como septicemia en animales jóvenes. Sin embargo se logra aislar este agente de cuadros neumónicos que varían en cuanto a su severidad, distribución y morfopatología.<sup>7</sup> Los períodos de incubación fluctúan desde los 2 hasta los 14 días después de la aparición del factor predisponente (infecciones primarias por virus o bacterias, humedad, estrés, etc.) la morbilidad es del 5 al 40%, mientras que la mortalidad varía del 5 al 20%.<sup>38, 39, 45</sup>

Las lesiones que se observan son áreas de consolidación con necrosis central y hemorragia en la periferia de estas áreas, hay depósitos de fibrina sobre la pleura. Los estudios histopatológicos demuestran neumonitis con áreas multifocales de bronconeumonía fibrino-purulenta aguda con necrosis coagulativa, pleuritis fibrinosa, y congestión capilar. Adicionalmente se puede observar la transformación de macrófagos dando un aspecto arremolinado o de "avena".

Se cree que este último cambio se debe al efecto tóxico de la leucotoxina.<sup>6, 39, 40, 50</sup> Es obvio que las lesiones descritas, ocasionan desde retrasos en el crecimiento hasta la muerte del individuo.<sup>2, 33, 34, 38, 39, 50</sup>

Se ha considerado a la leucotoxina, como el principal factor de virulencia de la bacteria; esta exotoxina está relacionada en todos los serotipos desde el punto de vista inmunológico, funcional y genético. La participación de la leucotoxina en la generación de daño tisular en el pulmón ocurre a través de la activación y destrucción de neutrófilos polimorfonucleares, además de inducir la liberación de histamina de las células cebadas del pulmón, lo que confirma la importancia de este mecanismo inflamatorio en el desarrollo de las lesiones a nivel pulmonar. Los efectos citotóxicos de *M. haemolytica* en el macrófago alveolar, pueden también contribuir con la severidad en la presentación de la enfermedad, al tener los macrófagos factores de descarga (iones superóxido, peróxido de hidrógeno, disminución de pH y enzimas entre otros) que causan irritación y deposición de fibrina.<sup>6, 7, 9, 11, 12, 39, 46</sup>

Con relación al concepto multifactorial de Complejo Respiratorio se menciona que los factores predisponentes antes mencionados, constituyen condiciones favorables para la presentación de la enfermedad, debido a que provocan estrés en el animal.<sup>30, 38, 43, 49</sup> Este estado de estrés es una reacción neuroendócrina que induce la liberación de esteroides, principalmente cortisol, el cual compromete aparentemente la capacidad inmunológica del hospedero en respuesta a los agentes infecciosos. En estos organismos se ha descrito la inhibición en la liberación de factores quimiotácticos por los macrófagos alveolares, bloqueo en la unión de estos factores a los granulocitos e inhibición de la capacidad de migración del macrófago alveolar; en ocasiones cuando se añade una higiene deficiente y una humedad relativa alta en el medio ambiente (80 %), se incrementa la posibilidad de que se presente la enfermedad.<sup>10, 23, 50</sup>

Otra situación de gran relevancia es la nutrición de los animales, recientemente se ha demostrado que las deficiencias de vitaminas y minerales influyen desfavorablemente en la capacidad de respuesta inmune; sin embargo no se ha determinado con exactitud la manera en que esto ocurre.<sup>43, 47, 49, 50</sup>

## **E) PREVENCIÓN**

La inmunización es reconocida como el mejor método para la prevención de neumonía causada por *M. haemolytica*, siempre y cuando contenga los antígenos asociados a protección, dado que ante un brote de esa enfermedad algunos animales mueren, otros enferman y se recuperan y al parecer otros no manifiestan signos clínicos, por ello que las investigaciones se han concentrado en la identificación y caracterización de inmunógenos potencialmente protectivos en cepas de origen ovino y bovino.<sup>1, 13, 14, 17, 20, 37, 38, 40, 41, 47, 52, 54</sup>

La comprensión de los factores de virulencia de los agentes infecciosos, combinado con un mejor conocimiento de la respuesta inmune, ha creado una revolución en el número de nuevos agentes que pueden ser potencialmente controlados por inmunización.<sup>13, 14, 15, 16, 41, 52</sup>

Hoy en día se cuenta con varios tipos de inmunógenos encontrando resultados satisfactorios en algunos casos. Los inmunógenos basándose en bacterias vivas de cultivos de 6 horas son los que han dado resultados más satisfactorios. Se argumenta que este tipo de biológicos son eficaces porque los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico (material capsular, leucotoxina y otros antígenos no muy bien definidos).<sup>13, 41, 47</sup>

Existen nuevos biológicos contra la pasteurelisis neumónica en el ganado. Dentro de estos se encuentran productos que contienen “bacterias fantasmas” de *M. haemolytica*. Este biológico se considera una innovación, ya que está formado únicamente por la envoltura celular bacteriana, la cual se obtiene por la inactivación de *M. haemolytica* por medio de la lisis del gen *E* de la estructura celular a través del fago X174 que produce inactivación enzimática a una temperatura elevada (42°C). Donde el aumento de la presión osmótica dentro de la bacteria, provoca que el citoplasma sea expulsado, dando como resultado una estructura celular bacteriana vacía. Estos “fantasmas” retienen toda la morfología y las características inmunogénicas y estructurales de una bacteria viva.<sup>32</sup>

La prevención de Pasteurelisis Neumónica por inmunización se ha intentado durante décadas. En relación al uso de las bacterinas, se ha discutido de manera amplia acerca de la protección que brindan, ya que la ineficacia de estos biológicos se debe a que al ser inoculados a un animal, se producen anticuerpos séricos, solo contra antígenos capsulares, sin embargo, existen otros antígenos que participan en la patogénesis de la enfermedad y que no están contenidos en estas bacterinas, como la leucotoxina de *M. haemolytica*, por lo que, los toxoides (bacterina + leucotoxina) tienden a ser más completos y por lo tanto más eficaces para la prevención.<sup>13, 14, 17, 52</sup>

A pesar de lo anterior, en México se siguen utilizando las bacterinas, sin saber a ciencia cierta su eficacia, serotipos utilizados y las características de las cepas contenidas. Las bacterinas de *M. haemolytica* que existen en el mercado nacional fueron desarrolladas en primera instancia para bovinos, en los cuales, se conoce que el serotipo más común involucrado en neumonías es el A1. La mayoría de estas bacterinas sólo contienen el serotipo A1 y se están utilizando en forma extensiva en ovinos y caprinos donde se han determinado otros serotipos con más frecuencia.

Si bien las bacterinas no contienen el serotipo A2 que es el más común en ovinos, existen en el mercado toxoides que poseen la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*, la cual es el antígeno mayormente caracterizado y que ha demostrado inducir una mejor protección, aparte de ser un antígeno común a todos los serotipos de *Mannheimia haemolytica*.<sup>37, 40, 41, 47</sup>

Las vacunas tienden a reducir la colonización de *Mannheimia haemolytica* en el tracto respiratorio, demostrado en cultivos bacterianos de exudado nasal, donde en el primer día de muestreo se ha logrado aislar un 70% de la bacteria mientras que después de la vacunación el porcentaje redujo a un 50%.<sup>19, 35</sup>

La eficacia de la vacunación requiere entre otras cosas, que la respuesta inmune esté encaminada a los factores o antígenos que estén relacionados con protección. Además es de utilidad examinar el estado inmune de los animales a nivel campo.<sup>16, 17, 20, 23, 41, 52</sup>

## JUSTIFICACION

En el CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR existe una línea de investigación relacionada con el desarrollo de un biológico que por sus características se espera que sea más eficiente que otros biológicos comerciales (principalmente bacterinas).<sup>13, 14, 17</sup> Estas características incluyen: La presencia de dos serotipos, el A1 y el A2; la utilización de cepas nacionales para su elaboración, la inclusión de un sobrenadante de cultivo rico en leucotoxina, la presencia en el sobrenadante de otros antígenos como proteínas de membrana externa y otros antígenos solubles.

## HIPOTESIS

- Si el biológico experimental contiene los antígenos A1, A2, y la leucotoxina de la bacteria, será capaz de tener una mejor respuesta serológica en los animales inmunizados en condiciones de campo que la inducida por los biológicos comerciales.<sup>14, 16, 17, 20, 35</sup>
- Si la vacunación contra *M. haemolytica* resulta eficiente, será capaz de reducir la carga bacteriana de las vías respiratorias altas.<sup>19, 35</sup>

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta serológica (por medio de las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y ensayo visual simple) a la aplicación de cuatro biológicos comerciales y uno experimental, utilizados para la prevención de la Pasteurelosis Neumónica en ovinos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los títulos de anticuerpos generados contra antígenos capsulares de *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 y A2 en sueros de ovinos inmunizados con cinco vacunas utilizadas para la prevención de la Pasteurelosis Neumónica en rumiantes.
- Determinar los títulos de anticuerpos generados contra la leucotoxina de *M. haemolytica* en suero de ovinos, inmunizados con cinco vacunas utilizadas para la prevención de la Pasteurelosis neumónica.
- Realizar el aislamiento de *M. haemolytica* a partir de exudado nasal en todos los grupos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

② **INMUNÓGENOS:** Se utilizó un inmunógeno experimental realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) denominado "A", 4 inmunógenos comerciales los cuales fueron designados como "B", "C", "D" y "E" además del grupo control.

- Las vacunas fueron inoculadas vía subcutánea de acuerdo a las especificaciones de los laboratorios comerciales. La vacuna experimental también se aplicó vía subcutánea (2ml) y el grupo control fue inoculado con solución salina fisiológica.
- La concentración de bacterias en cada vacuna no la especifica el laboratorio, sin embargo, los requisitos que establece la norma para la producción de biológicos manejan  $1 \times 10^9$  U.F.C. x ml, como mínimo para lanzar a la venta un biológico.<sup>55</sup>

② **CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA PREVENIR LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA Y QUE SE UTILIZARON EN LA EVALUACIÓN SEROLÓGICA COMPARATIVA EN OVINOS.**

GRUPO	INMUNOGENO	CARACTERÍSTICAS DEL BIOLÓGICO	DOSIS Y VÍA DE APLICACIÓN
1	"A" <i>"Experimental"</i>	Es un inmunógeno que contiene bacterias muertas formalinizadas de <i>M. haemolytica</i> , serotipo A1 y A2 y que además contiene un sobrenadante de cultivo rico en	2ml Subcutánea

	INIFAP	leucotoxina obtenida en la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria. Recomendada para su uso en bovinos, ovinos y caprinos. Lab. nacional	
2	“B” “Rodeo 9”  “Nor-Vet”	Formula: Cada dosis contiene <i>M. haemolytica</i> tipo 1, <i>P. multocida</i> serotipo A, <i>P. multocida</i> serotipo D, <i>Haemophilus somnus</i> , <i>Cl. chauvoei</i> , <i>Cl. septicum</i> , <i>Cl. novyi</i> , <i>Cl. sordelli</i> , <i>Cl. perfringens</i> A e hidróxido de aluminio como adyuvante. Recomendada para su uso en bovinos, ovinos y caprinos. Lab. nacional	2.5ml Subcutánea
3	“C” “One shot”  Pfizer	Bacterina toxoide de <i>M. haemolytica</i> tipo A1. Formula: Cada dosis contiene cultivos de <i>M. haemolytica</i> A1 propagado para incrementar la producción de leucotoxinas y antígenos capsulares y asociados a la célula bacteriana. Recomendada para su uso en bovinos. Lab. transnacional	2ml Subcutánea
4	“D” “Bac-tres-golfo”	Formula: Suspensión de cepas inactivadas y absorbidas en adyuvante oleoso de <i>Cl. chauvoei</i> , <i>Cl. septicum</i> , <i>P. multocida</i> A3 y <i>M.</i>	2ml Subcutánea

	Denkall Dawes Vet.	<i>haemolytica</i> A1. Recomendada para su uso en bovinos, ovinos y caprinos. Lab. nacional	
5	“E” “Bacterina doble PcE2”  Chinoi Productos Farmacéuticos	Formula: Cada ml contiene <i>M. haemolytica</i> A1, <i>P. multocida</i> serotipo A (Carter), <i>P. multocida</i> serotipo D (Carter), <i>Cl. chauvoei</i> y <i>Cl. septicum</i> . Recomendada para su uso en bovinos, ovinos y caprinos. Lab. nacional	2.5ml Subcutánea
6	“F” “Control”	Este grupo fue inoculado con solución salina fisiológica	2ml Subcutánea

📍 **ANIMALES:** En este estudio se utilizaron 180 corderos con características raciales indefinidas, clínicamente sanos y con una edad entre los 2 y 4 meses, todos provenientes de los Ranchos 1, 2 y 3. Los corderos se distribuyeron de manera aleatoria en 6 grupos de 30 ovinos cada uno

📍 Los 180 corderos se trabajaron dentro de 3 unidades productivas ubicadas en distintos sitios, cada unidad productiva fue llamada según el orden en que se trabajo y como fueron contactados los médicos que laboran en ellas, en el caso de la explotación ubicada en Tepetzotlán fue denominada Rancho 1 y los dos ranchos del estado de Tlaxcala como Rancho 2 y Rancho 3.

## 📍 Rancho 1: La Mora

El Rancho 1 se ubica en la población de Santiago Cuautlalpan perteneciente al municipio de Tepetzotlán, México. Esta unidad productiva cuenta con 150 animales, tiene como fin zootécnico la producción de corderos para abasto, la cual cuenta con un sistema de pastoreo diurno (pastos nativos) y encierro nocturno. Las ovejas por parir y lactando permanecen en confinamiento (aproximadamente tres meses).

Los corrales de alojamiento nocturno y para las ovejas por parir y lactando poseen piso de cemento, están cercados con barda de ladrillo y al frente tienen malla ciclónica. El techo es de lámina galvanizada. Los comederos son de tolva (para el alimento balanceado) y de varilla (para el forraje). El agua se ofrece a libertad en bebederos automáticos de pivote.

Las ovejas gestantes se separan aproximadamente un mes antes de que ocurra el parto, en la mayoría de las ocasiones se toma en cuenta el desarrollo de la glándula mamaria (cuando está *ubrada*). Cuando eso ocurre, se le ofrecen entre 500 y 750 g de alimento balanceado comercial (16% de proteína cruda) y forraje molido (alfalfa achicalada o rastrojo de maíz) a libertad.

Se registran los partos que van ocurriendo, anotando la fecha, número de la oveja, tipo de parto, sexo de la cría, peso y número del cordero. A los corderos recién nacidos, al momento del aretado y pesado, se les administra selenito de sodio (1 mg) por vía subcutánea. Cuando el cordero proviene del resultado de la cruce con carneros de razas laneras se descola empleando la pinza *burdizo*. A los 30 y 60 días después del nacimiento, a los corderos se les repite la aplicación de selenio.

El manejo sanitario del rebaño consiste en la desparasitación, para la cual se realizan muestreos de heces mensualmente por parte de los médicos encargados, para determinar la carga parasitaria y así realizar la desparasitación específica en caso necesario.

En cuanto a la inmunización, se aplica leucotoxide contra *Mannheimia haemolytica* para prevenir neumonía a todo el rebaño. A las ovejas cuando falta aproximadamente un mes para el parto y a los corderos en el momento del destete (entre los 60 y 75 días).

## **📍 Rancho 2: Los Álamos**

El Rancho 2 se ubica en la localidad de Huamantla, cabecera municipal de Huamantla, estado de Tlaxcala. El propósito productivo de esa unidad de producción es la generación de corderos para el abasto, cuenta con 480 animales, donde el tipo de ganado es de pelo, predominando el ganado tabasco. El ganado reproductor es alimentado principalmente mediante pastoreo diurno en praderas mixtas, implantadas e irrigadas, incorporándolas a los corrales después de las cinco de la tarde, donde son suplementadas con ensilaje de maíz y premezcla mineral, comercial la cual se revuelve con el alimento. Para el caso de gestantes en el último tercio de preñez y las lactantes, reciben además del ensilaje, un suplemento con granos, desperdicio de frituras y pasta de soya. Las hembras recién paridas hasta que cumplen cinco días de lactancia permanecen estabuladas con sus corderos, recibiendo tres veces la ración de suplemento, posteriormente se incorporan al rebaño general.

Los corrales para el alojamiento nocturno y para las ovejas recién paridas, eran en su construcción original zahúrdas, teniendo piso de cemento, están cercados con barda de ladrillo y con salida hacia asoleaderos.

El techo es de lámina galvanizada. Los comederos son de tolva y el agua se ofrece en medios tambos.

Se registran los partos que van ocurriendo, anotando la fecha, número de la oveja, tipo de parto, sexo de la cría, peso y número del cordero. A los corderos recién nacidos, al momento del aretado y pesado, se les administra selenito de sodio (1 mg) por vía subcutánea. Este corral cuenta con un área exclusiva para corderos donde se les administra un alimento a base de grano, pasta de soya, desperdicio de frituras y minerales, esto sucede cuándo los primeros corderos cumplen los 15 días de nacidos .

El manejo sanitario del rebaño consiste en la desparasitación, la cual se efectúa dos veces al año, no usan el mismo producto de manera consecutiva y a los corderos cuando cumplen dos meses de edad, edad a la cual se lleva a cabo el destete, se le aplica una bacterina toxoide para la prevención de enterotoxemia.

### **📍 Rancho 3: Santa Rebeca**

El Rancho 3 se ubica en la localidad de Cuapiaxtla, cabecera municipal de Cuapiaxtla, estado de Tlaxcala. El propósito productivo de esa unidad de producción es la generación de corderos para el abasto, cuenta con 1500 animales, el tipo de ganado es de pelo, predominando el ganado tabasco y cuenta con 1500 cabezas. El ganado reproductor es alimentado principalmente mediante pastoreo diurno en praderas mixtas implantadas e irrigadas, incorporándolas a los corrales después de las cinco de la tarde, donde son suplementadas con ensilaje de maíz, un suplemento a base de grano, pasta de soya y alfalfa; así como una premezcla mineral, comercial.

Las hembras recién paridas hasta que cumplen cinco días de lactancia permanecen estabuladas con sus corderos, recibiendo tres veces la ración de suplemento, posteriormente se incorporan al rebaño general.

Los corrales de alojamiento nocturno y para las ovejas recién paridas, consisten en una barda perimetral de block y techos de lamina galvanizada, cuentan con comederos de concreto y los bebederos son de medios tambos.

Se registran los partos que van ocurriendo, anotando la fecha, número de la oveja, tipo de parto, sexo de la cría, peso y número del cordero. A los corderos recién nacidos, al momento del aretado y pesado, se les administra selenito de sodio (1 mg) por vía subcutánea. Cuando los primeros corderos cumplen los 15 días de nacidos se instalan trampas para la suplementación predestete, con un alimento a base de grano, pasta de soya y minerales.

El manejo sanitario del rebaño consiste en la desparasitación, la cual se efectúa dos veces al año, no usan el mismo producto de manera consecutiva y a los corderos cuando cumplen dos meses de edad, edad a la cual se lleva a cabo el destete, se le aplica una bacterina toxoide para la prevención de enterotoxemia.

#### **A) CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN EXPERIMENTAL**

<b>Día</b>	<b>Gpo. 1</b>	<b>Gpo. 2</b>	<b>Gpo. 3</b>	<b>Gpo. 4</b>	<b>Gpo. 5</b>	<b>Control</b>
<b>0</b>	Sangrado basal, vacunación, obtención del suero y exudado nasal.					
<b>15</b>	Revacunación, sangrado, obtención del suero y exudado nasal.					
<b>30</b>	Sangrado, obtención del suero y exudado nasal.					
<b>45</b>	Sangrado, obtención del suero y exudado nasal.					

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

## **B) DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS CAPSULARES**

Se incubó la bacteria durante 18 horas, a una temperatura de 37°C, en medio sólido (agar sangre), posteriormente se cosecho en medio de infusión cerebro corazón (ICC) y se incubó por 24 hrs a 37°C para su crecimiento, después se calentó a 56°C por 30 minutos para inactivarla. Se le agregaron eritrocitos de bovino a 0.09% y se incubó por una hora a 37°C.<sup>18</sup>

Se agregaron 25 µl de PBS 1x en todos los pozos de las placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en "u", posteriormente se adicionó el suero problema en los pozos de la primera fila y se hicieron 6 diluciones dobles hasta llegar a 1:64, después de esto se agregaron eritrocitos sensibilizados con *M. haemolytica*, del serotipo a probar, a todos los pozos y se dejó reposar durante 1 hora para dejar precipitar los eritrocitos y poder leer los resultados. La formación de una roseta en el fondo de los pozos indicó la presencia de anticuerpos contra los antígenos capsulares. Por el contrario un botón de eritrocitos en el fondo indicó la ausencia de anticuerpos.<sup>18</sup>

## **C) OBTENCIÓN DE LEUCOTOXINA PARA LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE**

Se sembraron cepas de *M. haemolytica* biotipo A1 y A2 por separado en agar sangre, incubando durante 18 horas a 37 °C, después se cosecharon y se sembraron en matraces con medio RPMI-1640 adicionado con 7% de suero fetal bovino.

Se incubaron de 4-5 horas en baño María a 37 °C, donde se alcanzó la fase logarítmica de crecimiento, detectado por un cambio de color del medio que se torno de rosa a amarillo con una apariencia turbia.

Se centrifugó a 4,424 xg durante 10 minutos a 4°C; terminando la centrifugación se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en medio fresco para una segunda incubación de 1 a 2 horas a 37°C con movimiento constante.

Por último se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante del cual se obtuvieron alícuotas para determinar su efecto cotitótico por medio de ensayo simple visual (titulación de la leucotoxina).<sup>46</sup>

#### **D) CHOQUE HIPOTÓNICO PARA LA OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS**

El cual se realiza por medio de un cambio brusco generado por acción del agua destilada la cual produce lisis de eritrocitos, los cuales no se requieren para la elaboración de la prueba de ensayo visual simple. Esta lisis generada con agua destilada se detiene con una solución de PBS 2x y de esta manera se obtienen las células blancas previamente lavadas en tres ocasiones con PBS 2x y centrifugadas a 1,600 xg por 5 minutos a 4°C. Donde cada ml de solución contiene  $1 \times 10^6$  células blancas.<sup>46</sup>

#### **E) DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE LA LEUCOTOXINA**

Se agregaron 100 µl de medio RPMI-1640 en microplacas de titulación de 96 pozos de fondo plano, también 50 µl de leucotoxina a la primera fila de pozos, haciendo diluciones dobles hasta llegar a 1:64; después se adicionaron 100 µl de células blancas obtenidas por choque hipotónico y se incubó por una hora a 37 °C.

Se centrifugó a 1,600 xg durante 5 minutos a 4°C y se decantó. Se adicionó formol al 10% para fijar las células durante 20 minutos, y por último se agregó cristal violeta al 1% por 5 minutos.

Un fondo claro en los pozos indica la presencia de leucotoxina, la cual ejerce su actividad lítica sobre los leucocitos eliminando el sustrato celular a teñir, por otra parte un fondo de color azul indica la presencia de células y por lo tanto la ausencia de leucotoxina o el efecto de la dilución de la misma.<sup>46</sup>

#### **F) DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LA LEUCOTOXINA DE *Mannheimia haemolytica*, POR MEDIO DE LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE**

Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tiene la leucotoxina de *M. haemolytica* para lisar a las células "blanco", que en este caso fueron leucocitos de sangre periférica de ovino obtenidos mediante choque hipotónico.

En microplacas de titulación de 96 pozos de fondo plano se agregó a todos los pozos 100µl de RPMI-1640. También se adicionó en la primera fila 100µl de suero problema. Haciendo diluciones dobles de los sueros hasta llegar a 1:64, después se agregaron 50µl de leucotoxina con título de 1:2 previamente titulada y posteriormente se adicionaron 100µl de células blancas y se dejó incubando 1 hora a 37 °C.

Pasado el tiempo, se centrifugó a 1,600 xg durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se fijaron las células con formol al 10% durante 20 minutos; por último se tiñeron las células con cristal violeta durante 5 minutos y se enjuagaron con agua corriente.<sup>46</sup>

Como todos los pozos contienen leucotoxina:

- un fondo azul indicó la presencia de células y por lo tanto la presencia de anticuerpos en el suero de los ovinos que neutralizan a la leucotoxina.<sup>46</sup>
- un fondo claro indicó la ausencia de células y por lo tanto ausencia de anticuerpos en el suero.<sup>46</sup>

## **G) ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

De los resultados donde se determinaron los títulos de anticuerpos, se obtuvo el promedio de las seis determinaciones en cada animal y posteriormente fueron procesados por SPSS para realizar el análisis estadístico por medio de la prueba de Tukey con un valor  $\alpha$  de 0.05, donde el título de anticuerpos fue transformado a raíz cuadrada para su análisis y después se regreso a su valor original. Los resultados o promedios con la misma literal (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) no muestran diferencia significativa entre las medias del mismo muestreo, mientras que los valores con la literal (<sup>b</sup>) son estadísticamente diferentes entre muestreos.<sup>56</sup>

## **H) CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS DE *Mannheimia haemolytica***

Los aislamientos de *Mannheimia haemolytica* obtenidos de fosas nasales de ovinos se identificaron por su morfología colonial en placas de agar sangre.

En estas condiciones se desarrollaron colonias blanco grisáceas lisas y mucoides rodeadas de una pequeña zona de  $\beta$  hemólisis, que son

características de esta especie. Microscópicamente se observaron cocobacilos gram negativos pequeños.

Su identificación se basó en su comportamiento a pruebas bioquímicas establecidas para este género. Los diferentes aislamientos reaccionaron de manera similar a las pruebas de oxidasa (útil para identificar bacterias Gram (-) y aerobias), indol (detecta la producción de indol a partir del triptofano que contiene el medio, por actividad de la triptofanasa de la bacteria que hidroliza este aminoácido, el cual es positivo, cuando forma un anillo rojo), O/F (determina si las bacterias llevan a cabo un metabolismo oxidativo o fermentativo a partir de glucosa ), TSI (determina la fermentación de carbohidratos “glucosa, sucrosa y lactosa”, producción de ácido y gas además de la producción de ácido sulfhídrico) y Motilidad. <sup>4, 5, 11, 44</sup>

## RESULTADOS

Como se puede observar las figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, representan el título de anticuerpos generados por los diferentes biológicos contra los antígenos A1, A2 y la leucotoxina de *M. haemolytica* por rancho, de igual manera los cuadros representados con los mismos números, contienen todos los resultados (promedios y error estándar) de la titulación para cada una de las figuras; donde cada gráfica representa un rancho y que han sido llamados, para el caso de la explotación ubicada en Tepotzotlán es denominado Rancho 1 y los dos ranchos del estado de Tlaxcala son denominados como Rancho 2 y Rancho 3.

La escala de evaluación del título de anticuerpos se describe en la siguiente tabla, donde cada valor corresponde a la presencia del complejo antígeno – anticuerpo en las diluciones dobles (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64), realizadas en las pruebas (inhibición de la hemoaglutinación y ensayo visual simple) para la obtención de título de anticuerpos para los diferentes antígenos.<sup>37</sup>

Tabla 1

<b>Título de anticuerpos</b>	<b>Respuesta serológica</b>
70	Alta ó Buena
60	Alta ó Buena
50	Alta ó Buena
40	Media ó Regular
30	Media ó Regular
20	Baja ó Mala

10	Baja ó Mala
0	Baja ó Mala

En la Figura 1, Cuadro 1, se puede observar que en el día 15 de muestreo el título de anticuerpos de los biológicos A, C, D y E elevan más su respuesta que en los otros muestreos, lo cual muestra una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el biológico A del segundo muestreo, respecto a todos los biológicos muestreados los días 0 y 30, mientras que en el día 45 el biológico A es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) a los demás biológicos en el mismo muestreo. De manera general esta figura no muestra diferencia estadística entre biológicos por día de muestreo (excepto en el día 45), donde el título promedio de anticuerpos es de 20, generando una respuesta baja.

En la Fig. 2, Cuadro 2, el título de anticuerpos se encuentra en promedio en 30, lo cual quiere decir que se generó una respuesta regular en todos los biológicos, demostrando así que no hay diferencias significativas entre biológicos, ni entre muestreos; esto a pesar de que el biológico D tuvo una tendencia creciente en el último muestreo.

La Fig. 3, Cuadro 3, muestra un título de anticuerpos mínimo en todos los muestreos y en la mayoría de los biológicos, a excepción del biológico C con título de 40 en el muestreo del día 30, el cual es diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) a los biológicos de los muestreos de los días 0, 15 y 45, no así en su mismo muestreo donde no hay diferencias significativas.

La Fig. 4, Cuadro 4, en esta gráfica no se pueden observar diferencias estadísticas entre biológicos en el mismo día de muestreo, sin embargo se puede observar un título alto de anticuerpos en el primer muestreo (día cero), que en muestreos subsecuentes, en promedio esta figura representa un título bajo de anticuerpos.

En la Fig. 5, Cuadro 5, se puede observar que en la escala de evaluación está gráfica solo llega a 10 lo cual indica una respuesta mala de manera general en todos los biológicos y en cada día de muestreo, por lo que la diferencia estadística que existe entre el biológico D del día 15 y los biológicos del día 30 y 45 adquieren poca importancia.

Figura 6, Cuadro 6, como se puede ver en esta gráfica solo existe una diferencia significativa estadísticamente ( $P < 0.05$ ), la cual está representada por el biológico C del último muestreo, respecto a los demás biológicos, de todos los muestreos, el cual genera una respuesta que va de baja a regular (25).

Las siguientes gráficas que corresponden a las figuras 7, 8 y 9 generan una respuesta que se ubica en la escala de evaluación dentro de las bajas ó malas alcanzando una producción de anticuerpos de 10 a 20.

Figura 7, Cuadro 7, en esta gráfica no hay diferencias estadísticas entre muestreos, sin embargo el grupo control en el día 0 presenta un título de anticuerpos elevado comparado con los otros biológicos, mientras que el biológico C del día 30 genera una respuesta regular comparada con los demás biológicos, aunque ninguno es diferente estadísticamente.

Figura 8, Cuadro 8, esta gráfica manifiesta una respuesta antigénica regular en el día cero, la cual baja en los siguientes muestreos, mientras que el biológico E en el día 30 es diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) comparado con los biológicos del día 15 y 45 respectivamente.

Figura 9, Cuadro 9, lo más representativo de esta gráfica es el biológico D y E del día 15 los cuales son estadísticamente diferentes a los biológicos del mismo muestreo y a la mayoría de los biológicos del muestreo de los días 30 y 45 a excepción de los biológicos D (día 30) y A (del día 45).

Las figuras 10 y 11 y sus respectivos cuadros representan el promedio general de la titulación de anticuerpos generado por cuatro biológicos comerciales y un experimental por antígeno (Fig. 10) y por rancho (Fig. 11).

Figura 10, Cuadro 10, de manera general se puede observar una mejor respuesta en los biológicos contra el serotipo A1 comparado con la respuesta de los serotipos A2 y la Leucotoxina, donde la mejor respuesta entre biológicos corresponde al biológico A aunque no presenta diferencia estadística respecto a los demás biológicos, mientras que cada uno de los biológicos es significativamente diferente al grupo control. La respuesta para el serotipo A1 en promedio es de 10 lo cual indica una respuesta baja, mientras que para el serotipo A2 y la Leucotoxina la respuesta se encuentra en 5 de promedio, dando una respuesta mínima y poco representativa en todos los casos.

Figura 11, Cuadro 11, no se observo ninguna diferencia estadística entre ranchos, aunque hubo una respuesta mejor para el biológico A en el rancho 1 y 2; y para el biológico D en el rancho 2.

**© TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA EL ANTIGENO A1 DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 1.**

Cuadro 1

Vacuna	DÍA 0	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
<b>A</b>	9.0 ± 7.8	29.5 ± 8.3	15.2 ± 6.9	24.2 ± 7.8
<b>B</b>	1.7 ± 0.5	7.1 ± 1.7	14.8 ± 12.3	3.2 ± 1.4
<b>C</b>	2.9 ± 1.0	23.0 ± 9.5	0.8 ± 0.4	9.6 ± 2.8
<b>D</b>	10.5 ± 8.9	24.8 ± 10.8	1.3 ± 0.6	6.3 ± 3.1
<b>E</b>	3.5 ± 1.3	24.0 ± 9.0	0.0 ± 0.0	5.6 ± 1.7
<b>F</b>	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.6	3.0 ± 1.7	1.3 ± 1.3

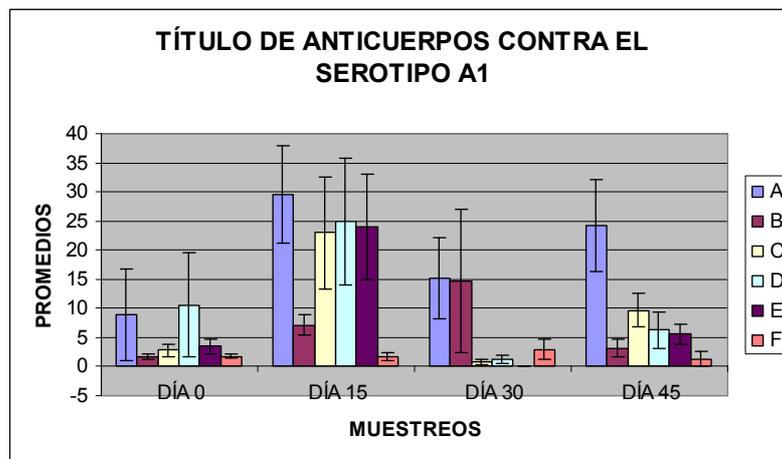


Figura. 1: Se observa que los biológicos A, C, D y E siguen el mismo patrón obteniendo títulos altos en el día 15, mientras que en los demás días no se presentó esto.

📌 **TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA EL ANTIGENO A1 DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 2.**

Cuadro 2

Vacuna	DÍA 0	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
<b>A</b>	19.6 ± 6.4	32.0 ± 8.5	16.2 ± 8.1	24.5 ± 7.5
<b>B</b>	17.1 ± 7.2	19.3 ± 6.7	7.0 ± 2.0	14.8 ± 5.0
<b>C</b>	10.2 ± 4.0	30.0 ± 12.3	8.6 ± 4.0	4.0 ± 1.4
<b>D</b>	10.5 ± 3.3	25.7 ± 8.1	14.0 ± 2.0	33.0 ± 31.0
<b>E</b>	11.2 ± 3.3	23.8 ± 7.5	5.7 ± 2.2	17.0 ± 15.0
<b>F</b>	13.1 ± 5.1	4.2 ± 2.0	4.0 ± 1.2	1.0 ± 1.0

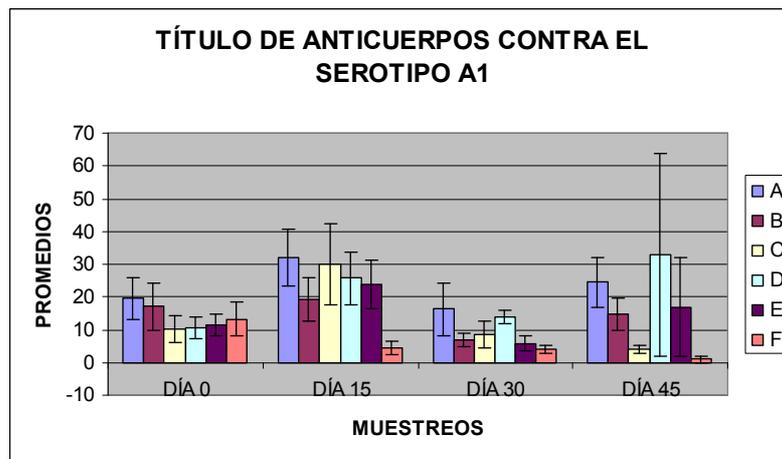


Figura. 2: Se observa que los biológicos A, B, C y E obtiene títulos altos en día 15, disminuyendo para el día 30 mientras que el biológico D tiene título más alto en el día 45.

**② TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA EL ANTIGENO A1 DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 3.**

Cuadro 3

Vacuna	DÍA 0	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
<b>A</b>	1.4 ± 0.7	2.2 ± 1.0	16.2 ± 4.4	8.0 ± 0.0
<b>B</b>	0.8 ± 0.5	2.5 ± 2.2	5.7 ± 4.5	6.8 ± 4.3
<b>C</b>	2.2 ± 0.5	4.2 ± 1.7	32.0 ± 12.0	6.6 ± 0.8
<b>D</b>	2.0 ± 1.1	6.2 ± 2.5	21.3 ± 9.8	6.0 ± 2.2
<b>E</b>	2.6 ± 1.2	1.1 ± 0.4	9.0 ± 3.8	11.6 ± 5.8
<b>F</b>	1.5 ± 0.5	0.7 ± 0.3	1.7 ± 1.1	2.6 ± 1.3

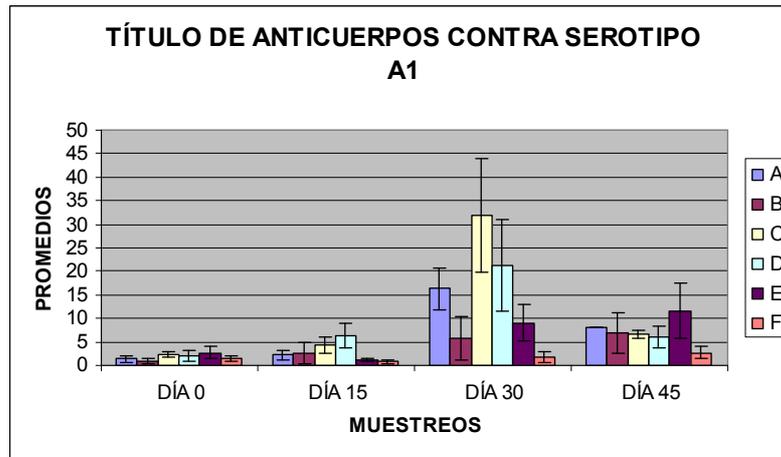


Figura. 3: Se observa que en el día 30 se obtiene el pico más alto de producción para los biológicos A, C y D.

**② TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA EL ANTIGENO A2 DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 1.**

Cuadro 4

Vacuna	DÍA 0	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
<b>A</b>	5.1 ± 2.2	11.5 ± 7.7	15.1 ± 9.2	8.0 ± 3.2
<b>B</b>	12.5 ± 8.8	14.2 ± 9.4	3.0 ± 0.5	4.0 ± 0.0
<b>C</b>	28.5 ± 10.4	0.2 ± 0.2	2.2 ± 1.0	0.4 ± 0.4
<b>D</b>	19.4 ± 11.5	11.3 ± 10.5	2.5 ± 1.8	2.0 ± 0.6
<b>E</b>	18.7 ± 10.0	7.8 ± 6.2	4.0 ± 1.6	8.7 ± 7.9
<b>F</b>	1.3 ± 0.8	4.0 ± 3.1	0.0 ± 0.0	2.0 ± 2.0

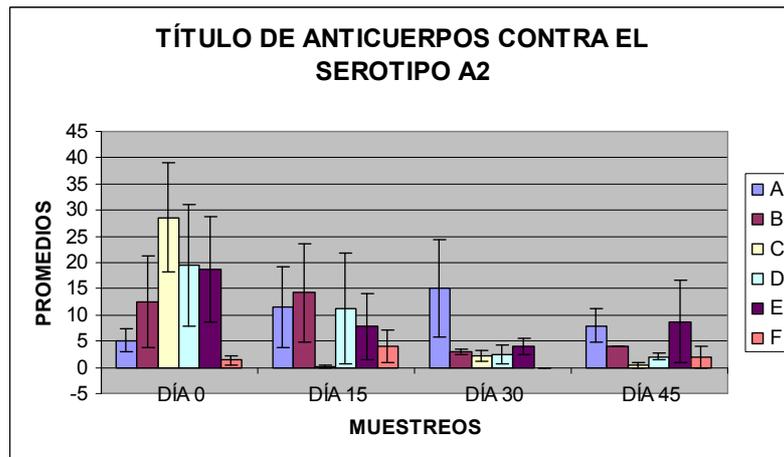


Figura. 4: Se observa que en el día 0 los biológicos B, C, D y E tienen la presencia de anticuerpos que van disminuyendo para los días 15, 30 y 45, mientras que el biológico A es el único que presenta una forma ascendente hasta el día 30 disminuyendo para el día 45.

**④ TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA EL ANTIGENO A2 DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 2.**

Cuadro 5

Vacuna	DÍA 0	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
<b>A</b>	0.5 ± 0.3	4.0 ± 1.8	1.6 ± 0.6	0.5 ± 0.5
<b>B</b>	1.0 ± 0.6	2.2 ± 0.8	2.3 ± 0.8	1.2 ± 0.8
<b>C</b>	2.5 ± 0.9	5.5 ± 1.5	2.0 ± 2.0	0.2 ± 0.2
<b>D</b>	4.0 ± 2.0	6.0 ± 3.4	1.0 ± 1.0	0.2 ± 0.2
<b>E</b>	2.2 ± 0.8	3.2 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.4
<b>F</b>	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2

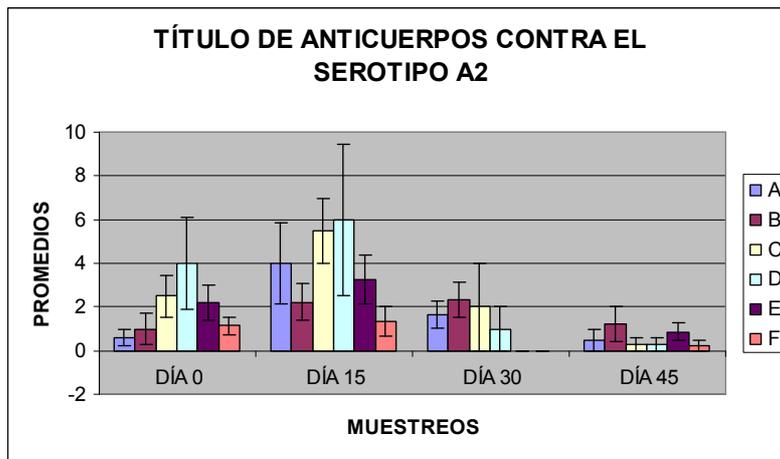


Figura. 5: Se observa como los biológicos A, B, C, D, E y el grupo control van aumentando su producción de anticuerpos en día 15 para después disminuir en los días 30 y 45.

**📍 TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA EL ANTIGENO A2 DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 3.**

Cuadro 6

Vacuna	DÍA 0	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
<b>A</b>	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.3	5.0 ± 2.4	1.3 ± 1.3
<b>B</b>	0.2 ± 0.2	2.8 ± 2.2	1.4 ± 0.5	0.5 ± 0.3
<b>C</b>	2.5 ± 1.9	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.3	25.5 ± 11.3
<b>D</b>	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.4	6.3 ± 5.2
<b>E</b>	0.7 ± 0.5	3.4 ± 2.1	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.6
<b>F</b>	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

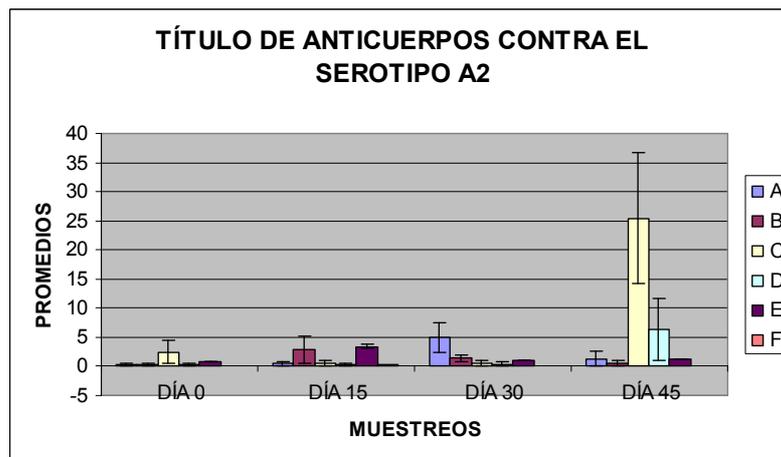


Figura. 6: Se observa que la respuesta de los biológicos es poco representativa en el día 15 y 30, existiendo una respuesta de los biológicos C para el día 45.

**TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA LA LEUCOTOXINA DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 1.**

**Cuadro 7**

Vacuna	DÍA 0	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
<b>A</b>	5.1 ± 0.9 <sup>a</sup>	11.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	15.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.6 <sup>a</sup>
<b>B</b>	12.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	14.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
<b>C</b>	28.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	2.2 ± 12.4 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>D</b>	19.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	11.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.3 <sup>a</sup>
<b>E</b>	18.7 ± 7.1 <sup>a</sup>	7.8 ± 6.3 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	8.7 ± 3.6 <sup>a</sup>
<b>F</b>	1.3 ± 10.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.0 <sup>a</sup>

**Figura 7**

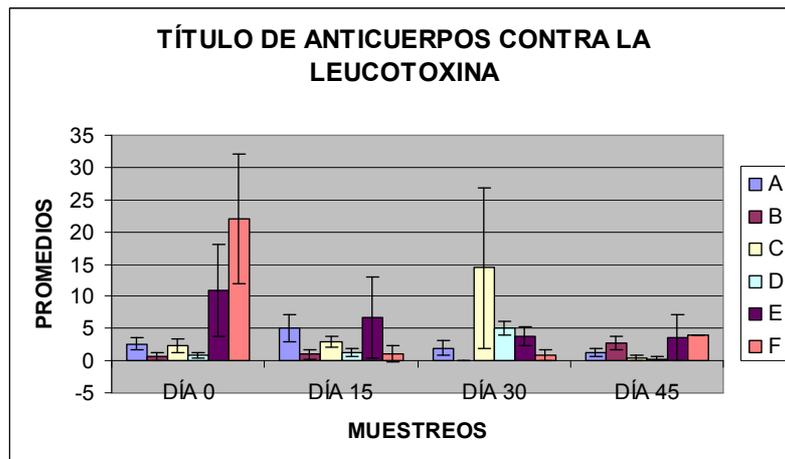


Figura. 7: Se observa que el biológico E y el grupo control presentan títulos de anticuerpos en día 0, mientras que el biológico C obtienen su pico alto el día 30.

🌀 **TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA LA LEUCOTOXINA DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 2.**

**Cuadro 8**

<b>Vacuna</b>	<b>DÍA 0</b>	<b>DÍA 15</b>	<b>DÍA 30</b>	<b>DÍA 45</b>
<b>A</b>	10.6 ± 6.1 <sup>a</sup>	6.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	3.5 ± 1.7 <sup>a</sup>
<b>B</b>	19.5 ± 9.8 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.4 ± 1.0 <sup>a</sup>
<b>C</b>	6.0 ± 5.2 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.6 <sup>a</sup>
<b>D</b>	0.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 11.7 <sup>a</sup>
<b>E</b>	19.0 ± 8.3 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	13.5 ± 7.4 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
<b>F</b>	1.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>

**Figura 8**

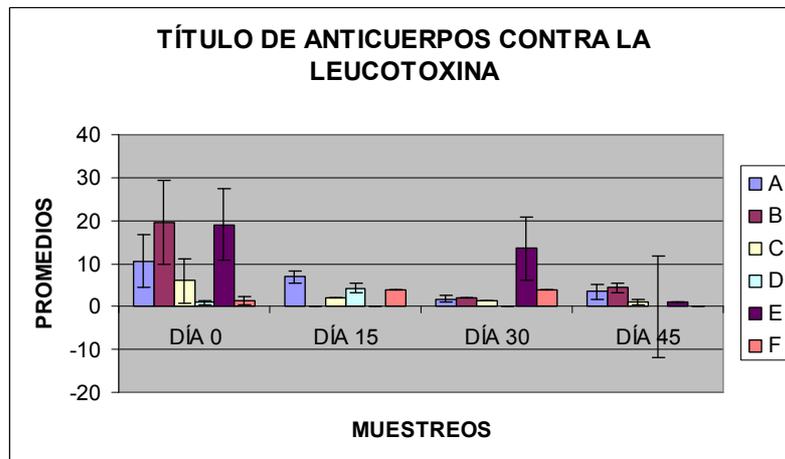


Figura. 8: Se observa que los biológicos A, B, C y E presentan títulos de anticuerpos altos en día 0.

**TÍTULO DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL CONTRA LA LEUCOTOXINA DE *Mannheimia haemolytica* EN EL RANCHO 3.**

**Cuadro 9**

Vacuna	DÍA 0	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
<b>A</b>	2.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
<b>B</b>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	3.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	10.9 ± 8.9 <sup>a</sup>
<b>C</b>	14.0 ± 10.1 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.7 <sup>a</sup>
<b>D</b>	5.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	16.5 ± 10.4 <sup>b</sup>	6.0 ± 5.2 <sup>a</sup>	2.0 ± 1.4 <sup>a</sup>
<b>E</b>	5.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	20.0 ± 9.8 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
<b>F</b>	2.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>

**Figura 9**

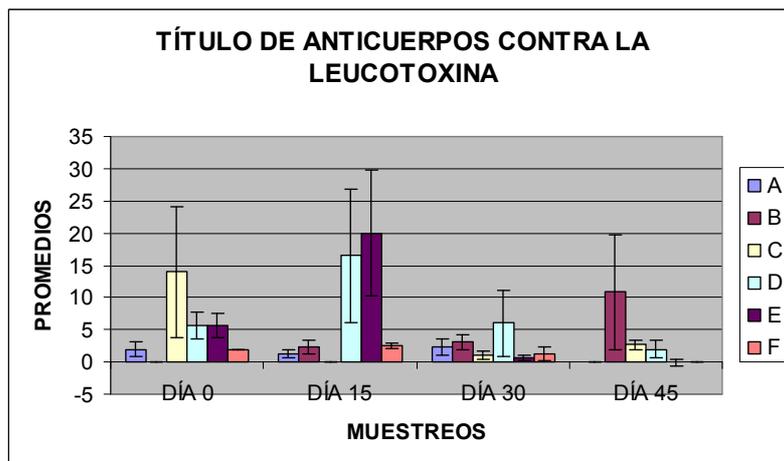


Figura. 9: Se observa que en el día 0 hay presencia de anticuerpos en el biológico C. Mientras que los biológicos D y E obtienen su pico de producción en el día 15.

**◉ PROMEDIO GENERAL DE LA TITULACIÓN DE ANTICUERPOS GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN EXPERIMENTAL POR ANTIGENO.**

Cuadro 10

Vacuna	A1	A2	A3
<b>A</b>	16.53 ± 4.88	4.47 ± 2.74	3.28 ± 1.26
<b>B</b>	8.43 ± 3.17	3.81 ± 2.33	3.88 ± 1.56
<b>C</b>	11.21 ± 1.20	5.91 ± 1.68	4.03 ± 0.72
<b>D</b>	13.49 ± 3.69	4.49 ± 2.18	3.57 ± 2.00
<b>E</b>	9.61 ± 2.50	4.34 ± 2.74	7.08 ± 0.65
<b>F</b>	3.08 ± 1.27	0.86 ± 0.52	3.59 ± 1.71

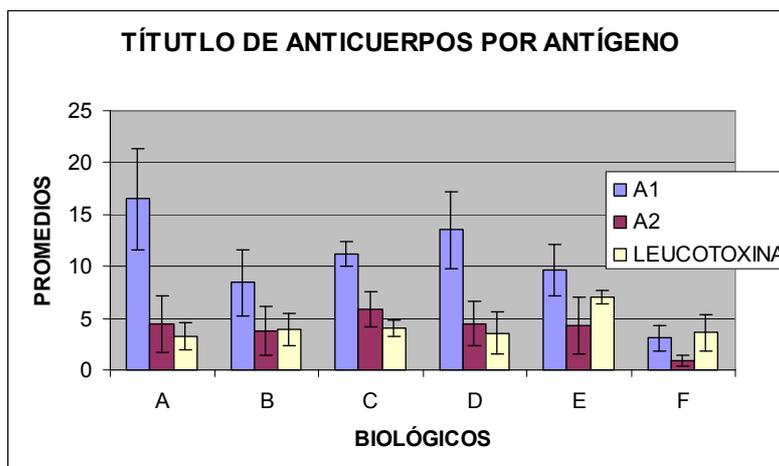


Figura.10: De los resultados obtenidos se muestra que el biológico A que corresponde a la vacuna experimental contiene una respuesta alta con respecto a los demás biológicos, siendo esto para el antígeno A1. Mientras que el biológico C forma mayor título de anticuerpos contra el A2, y el biológico E para la leucotoxina.

**② PROMEDIO GENERAL DE LA TITULACIÓN DE ANTICUERPOS  
GENERADO POR CUATRO BIOLÓGICOS COMERCIALES Y UN  
EXPERIMENTAL POR RANCHO.**

Cuadro 11

Vacuna	RANCHO 1	RANCHO 2	RANCHO 3
<b>A</b>	7.78 ± 4.85	7.19 ± 6.57	2.94 ± 1.81
<b>B</b>	4.42 ± 2.23	5.51 ± 3.76	2.26 ± 0.92
<b>C</b>	6.78 ± 1.20	5.06 ± 3.55	7.22 ± 1.99
<b>D</b>	6.13 ± 2.71	6.19 ± 6.26	4.81 ± 2.17
<b>E</b>	6.58 ± 1.02	5.79 ± 3.72	3.48 ± 1.53
<b>F</b>	2.39 ± 1.69	2.38 ± 1.45	0.73 ± 0.50

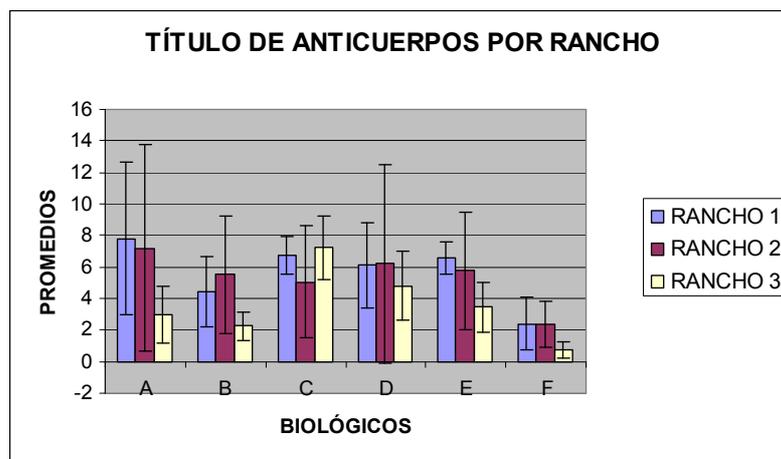


Figura.11: De los resultados obtenidos se muestra que el biológico A que corresponde a la vacuna experimental contiene una respuesta mayor con respecto a los demás biológicos para los ranchos 1 y 2, mientras que biológico C tuvo mejor respuesta en el rancho 3.

## ④ CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS DE *Mannheimia haemolytica*

El promedio de incidencia total *Mannheimia haemolytica* fue de 5.5 %, dando por entendido que los demás animales fueron negativos a las pruebas realizadas, lo cual se puede observar en el cuadro 11, que representa el número de bacterias que tuvieron un comportamiento similar en las pruebas bioquímicas y que por lo tanto demuestran la presencia de *Mannheimia haemolytica*. Así mismo se puede observar una reducción de la presencia de la bacteria en los muestreos subsecuentes del día 0, ya que en este día se aisló un 2.7 % de la bacteria en el aparato respiratorio alto, mientras que para el segundo muestreo redujo a un 0.5 % y que para el día 35 no hubo presencia de la bacteria, por último en el muestreo del día 45 nuevamente se pudo aislar la bacteria en un 2.2 %, tomando en cuenta que el porcentaje total aislado es muy bajo y se considera dentro del rango aceptado como parte de la microbiota normal de cavidad nasal.

## ④ PRUEBAS BIOQUÍMICAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Mannheimia haemolytica*

Cuadro 12: Se muestra que el promedio de incidencia total *Mannheimia haemolytica* fue de 5.5%, tomando en cuenta el total de animales muestreados y que en muestreos posteriores redujo.

Muestreo	Motilidad	TSI	O/F	Oxidasa	Indol
4°	-	Ac/Ac	F	+	-
4°	-	Ac/Ac	F	+	-
1°	-	Ac/Ac	F	+	-
2°	-	Ac/Ac	F	+	-
4°	-	Ac/Ac	F	+	-
4°	-	Ac/Ac	F	+	-
1°	-	Ac/Ac	F	+	-
1°	-	Ac/Ac	F	+	-
1°	-	Ac/Ac	F	+	-
1°	-	Ac/Ac	F	+	-

## DISCUSIÓN

Al evaluar la respuesta serológica de los biológicos utilizados para la prevención de Pasteurelisis neumónica en ovinos, se pudo observar que en los ranchos 1, 2 y 3, los inmunógenos tuvieron una respuesta serológica mayor a el serotipo A1, representado en las figuras y cuadros 1, 2, 3 y 10, esta respuesta puede deberse a que los biológicos utilizados fueron elaborados para ganado bovino. Sin embargo el A2 es el serotipo más importante en ovinos, lo cual fue estudiado por Thompson en 1977, donde demostró que de 406 muestreos, el serotipo mas frecuente en ovinos fue el A2 con un 33% de todas las muestras obtenidas<sup>48</sup>, por lo que se puede suponer que los inmunógenos que se usaron no contienen el serotipo A2 o bien lo contienen en una concentración muy baja, ya que no existen métodos para evaluar la concentración de los antígeno después de su inactivación al someterlos a altas temperaturas, como en el caso del biológico experimental donde se obtuvo la concentración de los serotipos al momento de elaborarse, pero después de elaborado e inactivado ya no se puede determinar la concentración de estos antígenos debido a la ausencia de esta metodología .

Con referencia a los resultados del título de anticuerpos generado por los cuatro biológicos comerciales y el experimental contra la leucotoxina se encontró una variación en el título de anticuerpos generados por algunos biológicos representado en las figuras 7, 8, 9 y 10, como ejemplo el biológico E de la figura 10 donde se obtuvo una mejor respuesta, así como en el muestreo inicial de las figuras 7, 8 y 9, mientras que otros biológicos simplemente dieron una respuesta mínima, lo cual sugiere que el título de anticuerpos generado pudo deberse a una infección previa subclínica o clínica en recuperación y talvez no fue precisamente por la vacunación.

García menciona que cuando existe una exposición temprana a un antígeno el sistema inmune actúa formando una respuesta, la cual es producir anticuerpos contra dicho antígeno.<sup>21</sup>

En el aspecto de promedio general de la titulación de anticuerpos generado por cuatro biológicos comerciales y uno experimental, se observó que la respuesta serológica a la vacunación fue variable en todos los biológicos, como se muestra en las figuras 10 y 11, ya que en algunos casos al momento de la vacunación (día cero) había presencia de anticuerpos contra los principales antígenos de la bacteria, este hecho puede deberse a que la bacteria es parte de la microbiota y por lo tanto, ya existe una interacción del agente contra el sistema inmune, también es posible que algunos animales hayan padecido un cuadro neumónico antes de la vacunación, por lo que la inmunización no puede considerarse como un indicador de protección como lo sugiere Dereck 1989, aunque autores como Mutters 1985 sugieren lo contrario e indican que el título de anticuerpos elevado está relacionado con la protección y con la disminución de daño pulmonar a la necropsia, evaluado después del desafío.<sup>17, 44.</sup>

De lo reportado en resultados anteriores en base a los cuadros y graficas ( Figuras 1-11), determinamos que los biológicos que se utilizaron, fueron similares a los empleados en un estudio realizado en Minnesota, los cuales no generaron el mismo nivel de anticuerpos, ya que los biológicos que se utilizaron dieron una respuesta inmunológica alta<sup>16</sup>, a diferencia del presente trabajo donde se obtuvo una respuesta serológica mínima en todos los serotipos estudiados.

En este trabajo los títulos elevados del muestreo basal sugieren que pudo haber influencia de inmunidad pasiva, ya que la ingestión de calostro al nacimiento de los corderos genera la presencia de anticuerpos contra antígenos que estuvieron presentes en la madre <sup>21, 29, 36</sup>, sin embargo este no puede ser el caso ya que los animales utilizados tenían de dos a cuatro meses de edad y la inmunidad pasiva natural solo dura los primeros dos meses de vida del animal, lo cual afirma a un más el hecho que hubo una infección antes de la vacunación.

En el presente trabajo se pudo comprobar que la inmunización esta relacionada con la disminución de *M. haemolytica* en las vías respiratorias altas, ya que la presencia de esta bacteria fue aislada en muestreos posteriores al basal, principalmente en el grupo control, aunque también se presento un bajo porcentaje en otros grupos. Así como en otros trabajos donde utilizaron vacunas multivalentes con los serotipos A1, A2 y T10 y vacunas con bacterias muertas, aplicando de 1 a 2 dosis, demostrando una reducción en la presencia de la bacteria. Sin olvidar que la bacteria es parte de la microbiota normal de vías respiratorias altas y que el porcentaje encontrado fue muy bajo. <sup>19, 35</sup>

## CONCLUSIONES

Los biológicos contra el serotipo A1 no mostraron diferencia significativa estadísticamente, sin embargo los biológicos contra este serotipo tuvieron mejor respuesta en comparación con el serotipo A2 y la leucotoxina.

Mientras que para el serotipo A2 fue baja y tampoco hubo diferencia significativa entre los biológicos utilizados, lo cual debe considerarse en trabajos posteriores ya que este serotipo es el más importante en los ovinos.

En caso de los anticuerpos generados contra la leucotoxina, se observa que la respuesta es mayor en el biológico "E" presentándose una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) respecto a los demás biológicos.

En cuanto al aislamiento de *Mannheimia haemolytica* del exudado nasal, el grupo control fue el que presentó el mayor porcentaje de aislamiento de la bacteria, reduciendo así la presencia de ésta en el aparato respiratorio alto en los demás grupos, considerando que el porcentaje total aislado es muy bajo y se considera dentro del rango aceptado como parte de la microbiota normal de cavidad nasal.

## LITERATURA CITADA

1. Aguilar RF, Jaramillo ML, Morales AJF, Trigo TFJ, Suárez GF. Evaluación de la protección contra la pasteurelosis neumónica en corderos vacunados con diferentes antígenos *Pasteurella haemolytica* A1. Vet Méx. 1997; 28 (3).
2. Aguilar TC, Tórtora PJ. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa alta, DF. Memoria del III congreso Nacional de Producción Ovina. 1998; 146.
3. Aley MR, Clarke JL. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. N Z Vet J. 1977; 25-200.
4. Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov, comb. nov, *Mannheimia granulomatis* comb. nov, *Mannheimia glucosida* sp nov, *Mannheimia ruminalis* sp nov, and *Mannheimia varigena* sp nov. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 67-86.
5. Barallo S, Reglero A, Revillan-Nuin B, Martínez BH, Rodrigues A LB, and Ferro MA. Regulations of capsular polysialic acid biosynthesis by temperature in *Pasteurella haemolytica* A2. FEBS Letters. 1999; 445: 325-328.
6. Berggren KA, Baluyut CS, Simonson RR, Bemrick WJ, Maheswaran SK. Cytotoxic effect of *Mannheimia haemolytica* on ovine neutrophils. Am J Vet Res. 1981; 42-1383.
7. Breider MA., Kumar S, y Corstvet RE. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* Pathogenic factors, Infect. Inmun, 1990; 58: 1671-1677.

8. Breider MA, Kumar S, y Corstvet RE. Protective role of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated endothelial cell damage, Infect. Immun, 1991; 59:4570-4575.
9. Burrows LL, Olah-Winfield E, y Lo RYC. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16, Infect. Immun, 1993; 61:5001-5007.
10. Carlton LG and Thoen ChO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University press/ames. 2<sup>a</sup> edition. 1997; 156-165.
11. Chang YF, Young RD, y Struck DK. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, Infect. Immun. 1987; 55:2348-2354.
12. Clinkenbeard KD, y Upton M. Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, Infect. Immun, 1991; 57: 420-435
13. Confer AW, Panciera RJ, Corstvet RE, Rummage JA, Fulton RW. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. Am. J. Vet. Res. 1984; 45: 2543.
14. Confer AW, Panciera RJ, Fulton RW, Gentry MJ, Rummage JA. Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 1985; 46: 342.
15. Confer AW, Panciera RJ, and Mosier DA. Bovine pneumonic pasteurellosis: immunity to *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 1993; 54: 1308 -1316 (1998).
16. Cravens. R. Comparative evaluation of the immunological response to virulence factor of *Pasteurella haemolytica*. Technical Bulletin. Julio 1996.
17. Dereck AM, Simons KR, Confer AW, Panciera RJ, Clinkenbeard KD. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infect Immun. 1989; 57: 711-716.
18. Frank GH, Wessman GE. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. J Clin Microbiol. 1978; 7: 142-145.

19. Frank GR, Briggs R, Loan C, Purdy E, Zehr. Respiratory tract disease and mucosal colonization by *Pasteurella haemolytica* in transported cattle. American Journal of Veterinary Research. Vol 57. No 9. Sept 1996.
20. Friend SCE, Wilkie BN, Thomsom RG, Barnum DA. Bovine pneumonic pasteurellosis: experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. Vet. J. 1997; 41:77-83.
21. García TF. Fundamentos de inmunología. UNAM.1° Edición. 1997; 15-39.
22. Gentry ML, y Richard E. Extraction of capsular material from *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res. 1981; 9:239-250.
23. González CT, y Maheswaran SK. The role of induced factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: review and hypotheses, Br. Vet. J. 1993; 149:183-194.
24. Green GM. In defense of the lung, Am. Rev. Resp. Dis. 1971; 102: 691.
25. Green GM, Jakab GJ, Low RB, y Davis GS. Defense mechanisms of the respiratory membrane, Am. Rev. Resp. Dis. 1977;102:691
26. Hughes HPA, Campos M, Mc Dougall L, Beskorwayne TK, Potter AA, y Babiuk LA. Regulation of major histocompatibility complex class II expression by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, Infect. Inmun.1994; 62:1609-1615.
27. Jaramillo ML. Participación de una hemaglutinina en la adhesión y patogenia de *Pasteurella haemolytica* A1 y evaluación de su inmunogenicidad en ovinos. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina UNAM, 2003
28. Kaehler KL, Markham RJF, Muscoplat CC, and Johnson DW. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. Infection and immunity. 1980; 30: 615-616.
29. Kaltreider HB, Kyselka L, and Salmon SE. Immunology of the lower respiratory tract. The journal of clinical investigation. Vol 54 August 1974; 263-270.

30. Lea Master BR, Evermann JF, Lehmkuhl HD. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootic of respiratory tract disease in recently weaned lambs J. A. V. M. A. 1987;190-1545.
31. Maheswaran SK, Kannan MS, Weiss DJ, Reddy KR, Townsend EL, Yoo HS, Lee BW, y Whiteley LO. Enhancement of neutrophil-mediated injury to bovine pulmonary endothelial cells by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, Infect. Immun, 1993; 61:2618-2625.
32. Marchart J, Rehagen M, Dropmann G, Szostak MP, Alldinger S, Lechleitner S, Schlapp T, Resch S, Lubitz W. Protective immunity against pasteurellosis in cattle, induced by *Pasteurella haemolytica* ghosts. Vaccine, 21, 2003; 1415-1422.
33. Martínez BJ. Efectos adversos sobre los mecanismos de depuración pulmonar del tracto respiratorio y su relación con Pasteurellosis Neumónica; Monterrey, Nuevo León., México., Memorias del Seminario sobre Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino, 1995; 10.
34. Mayagoita LA. Morfofisiología del aparato respiratorio. Memorias 2del Seminario sobre Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, Nuevo León., México, 1995; 8-9.
35. Miller MW. Evaluation of a multivalent *Pasteurella haemolytica* vaccine in bighorn sheep: safety and serologic responses. J Wildl Dis, 1997 oct. 33(4), 738-748.
36. Montaraz JA. Introducción a la inmunología. UNAM. 1° edición. 1997; 19-31.
37. Morales AJF. Evaluación experimental y en campo de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos, Tesis para maestría en Producción Animal., Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 1991.
38. Morales AJF. Avances y perspectivas sobre inmunización contra la pasteurellosis neumónica en ovinos. Inmunología del aparato respiratorio. Editado por Aguilera FJL. et al. UNAM, ISBN. 1996; 968-36-4332-9.

39. Morales AJF. El complejo respiratorio de los ovinos. Vet. Méx. 1996; 31: 50-55
40. Morales AJF, Jaramillo ML, Oropeza VZ, Tórtora PJJ, Trigo TFJ, Espino RG. Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. Vet. Méx. 1993; 24: 97-105.
41. Morales AJF, Martínez MOL. El uso de inmunógenos para la prevención de neumonías en ovinos, Memorias del Curso de Bases de la Cría Ovina. 2002.
42. Mork DW, Watts TC, Acres SD, Costerton JW. Electron microscopic examination of cells of *Pasteurella haemolytica* A1 in experimentally infected cattle. Department of biology, University of Calgary, Alberta. Can J Vet Res 1998 Jul; 52 (3): 343-348.
43. Moreno CB, Tórtora PJJ y Trejo GAA. Causas de morbilidad y mortalidad en corderos. Bases de la cría ovina III (AMTEO) Querétaro, Qro. 1996; 75-76.
44. Mutters RP, Ihm S, Pohl W, Frederiksen W. Mannheim Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stamatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. Int. J. Syst Bacteriol. 1985; 35: 309-322.
45. Ramírez RR, y Brogden KA. Patogénesis del daño pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*. Rev. Lat- AMER. Microbiol. 1995; 37: 353-365.
46. Shewen PE, y Wilkie BN. *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by typespecific rabbit antisera, Am. J. Vet. Res. 1983; 44:715
47. Téllez LI, Salazar L. Evaluación de una vacuna comercial y una experimental contra la pasteurelosis neumónica en ovinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 2000.

48. Thompson DA, Fraser J, and Gilmour. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in ovine pasteurellosis. *Research in Veterinary Science*, 1977; 22, 130-131.
49. Tórtora PJL. Mortalidad de corderos en el modelo de producción ovina mexicano. *Academia veterinaria mexicana A. C. Bases de la cría ovina II Querétaro, Qro.* 1995; 123-130.
50. Trigo FJ. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. En: *Ciencia Veterinaria 4:1 Vol. 4 UNAM*, 1987; 11.
51. Utley SR, Bhat UR, Byrd W, y Kadis S. Characterization of lipopolysaccharide from four *Pasteurella haemolytica* serotype strain: Evidence for presence of sialic acid in serotypes 1 and 5, *FEMS Microbiol. Letters*, 1992; 92:211-216.
52. Walker RD, Corvet RE, Lessley BA, y Panciera RJ. Study of bovine pulmonary response to *Pasteurella haemolytica*: Specificity of immunoglobulin is isolated from the bovine lung, *Am. J. vet. Res.*, 1980; 41:1015-1023.
53. Whiteley LO, Maheswaran SK, Weiss DJ, y Ames TR. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1 derived endotoxin, leukotoxin and capsular polysaccharide in Experimental bovine *Pasteurella pneumonia*, *Vet. Pathol.*, 1990; 27:150-161.
54. Wilkie BN, y Markhem RJF. Sequential titration of bovine lung and serum antibodies after parenteral or pulmonary inoculation with *Pasteurella haemolytica*, *Am. J. Vet. Res.*, 1979; 40:1690.
55. NORMA Oficial Mexicana NOM-049-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la pasteurellosis neumónica bovina producida por *Pasteurella multocida* serotipos A y D.
56. Programa de análisis estadístico SPSS versión 11.0.