



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE LEUCOTOXINA EN AISLAMIENTOS DE  
*Mannheimia haemolytica* PROVENIENTES DE EXUDADOS  
NASALES DE BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

Meztli Méndez Lozano

Asesores

Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango

Dr. Francisco Aguilar Romero

Dr. Rigoberto Hernández Castro

México, DF 2010



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores, Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango, Dr. Francisco Aguilar Romero y Dr. Rigoberto Hernández Castro, por guiarme hasta la conclusión de este trabajo.

A los proyectos PAPIIT IN208708 y CONACyT CB-104031, por el financiamiento otorgado.

Al Dr. Francisco Morales por su amable ayuda en el trabajo de laboratorio, a todos los demás miembros del Laboratorio de Diagnóstico del CENID-Microbiología: Lupita, Alma, Selenita, y a los servicios sociales.

Al Dr. Eugenio Villagómez Amezcua Manjarrez, por su colaboración en esta tesis.

Al amable jurado, por las correcciones aportadas a este trabajo.

A mi preciosa casa de estudios, la UNAM, que me ha dado tantas satisfacciones.

## DEDICATORIA

A mi mamá; porque te admiro y esto es fruto del esfuerzo tuyo y de mi papá.

A mi papá; donde quiera que este tu cielo, espero que esta tesis te haga sentir orgulloso de mí.

A mi tío Jorge; por todos tus cuidados cuando éramos niñas y porque lo sigues haciendo actualmente.

A mi hermana; por todo lo que me has enseñado y porque sé que siempre estarás ahí.

A mi abuelita Carmelita; por el amor que das a los que te rodean y por ser la abuela de todos.

A mi abuelita Natalia; porque unas palabras tuyas me guiaron a mi camino.

A todos y cada uno de los miembros de la familia “L”, incluidos los que desafortunadamente ya no están con nosotros. Larga vida a nuestro árbol de guayas.

A todos los miembros de la “pared”: Usiel, David, Félix, Maciel, Norma, Aranzazù, Higinio, Luis, Soraya, Tepox, Laura.

A César e Irene; gracias por estar ahí siempre.

A mis amigos de la carrera: Tosi, Mariana, Chava, Dona y Fran.

A todas mis compañeras de Pumas; especialmente a Brenda, Meche, July, Paolis, Jackie y Nancy. Gracias “equipo”.

A Coyo y Luz, porque son parte importantísima de mi vida.

A mi casa de estudios; por sus 100 años de existencia.

A mis amigas inseparables de la prepa que después de tantos años seguimos juntas: Kika, Guada, Viernes, Dulce y Adri.

A todos mis sobrinos postizos; porque quiero a sus madres como mis hermanas: Saidi, Keyra, Gibrón Argel y Luis Eduardo, y a todos los que más adelante se unirán a esta lista.

A todos los animales que me ayudaron en mi formación profesional y a los que han formado parte de mi vida. Kiki y manchita las adoro.

A todas las personas que, directa e indirectamente, ayudaron a formar la persona que soy y que me han apoyado en diversos momentos de mi vida.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO.....	2
1.2 CARACTERÍSTICAS DE <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	3
1.3 FACTORES DE VIRULENCIA.....	6
1.3.1 LEUCOTOXINA.....	8
1.3.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LEUCOTOXINA.....	10
1.4 CONTROL Y PREVENCIÓN.....	12
2 JUSTIFICACIÓN.....	13
3 HIPÓTESIS.....	14
4 OBJETIVO GENERAL.....	15
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	15
5.2 RECUPERACIÓN DE CEPAS Y OBTENCIÓN DE LEUCOTOXINA.....	15
5.3 OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS.....	16
5.4 ENSAYO VISUAL SIMPLE PARA LA DETECCIÓN DE LEUCOTOXINA....	17
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	17
6 RESULTADOS.....	18
7 DISCUSIÓN.....	24
7.1 CONCLUSIONES.....	29
REFERENCIAS.....	30

## RESUMEN

MÉNDEZ LOZANO MEZTLI. Detección de leucotoxina en aislamientos de *Mannheimia haemolytica* provenientes de exudados nasales de bovinos productores de leche (Bajo la dirección de: Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango, Dr. Francisco Aguilar Romero y Dr. Rigoberto Hernández Castro)

*Mannheimia haemolytica* es el principal agente etiológico bacteriano presente en las enfermedades respiratorias de bovinos, causando grandes pérdidas económicas debido a la mortalidad que ocasiona, a los efectos negativos sobre la ganancia de peso y sobre la eficiencia en la conversión alimenticia de los animales, así como al costo de los tratamientos para su control. Dentro de sus factores de virulencia, posee una leucotoxina con actividad específica sobre los leucocitos de rumiantes y se ha comprobado que su participación es fundamental para el desarrollo de una vacuna eficaz para el control de la enfermedad. Diversos métodos se han utilizado para detectar y/o cuantificar su actividad incluyendo la prueba de ensayo visual simple, siendo algunas de las ventajas de esta última que es rápida, simple y barata; no necesita equipo especializado para su lectura y permite trabajar con 6 sueros diferentes en una misma microplaca de titulación. El objetivo del presente trabajo fue determinar mediante el ensayo visual simple, la capacidad de producción de leucotoxina y realizar una aproximación a su cuantificación en 71 aislamientos de *M. haemolytica* provenientes de exudado nasal de bovinos sanos (n=40) y enfermos (n=31). A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza y se determinó la razón de momios, encontrando diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en la producción de leucotoxina entre los aislamientos de animales enfermos y la de los sanos, siendo mayor en los primeros (RM=7.64, IC<sub>95%</sub>= 1.78-37.6). Así mismo, se detectó producción de leucotoxina en 50 de las cepas probadas, perteneciendo 22 de éstas a animales sanos y 28 a enfermos. El título más alto encontrado en las cepas de animales sanos fue de 1:2, mientras que en las de animales enfermos fue de 1:4.

Tesis de licenciatura parcialmente financiada como parte de los proyectos PAPIIT IN208708 y CONACyT CB-104031.

# 1 INTRODUCCIÓN.

## 1.1 COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO

Las neumonías corresponden aproximadamente al 75% de los casos clínicos que se presentan en las explotaciones de bovinos y están asociadas en 45- 55% de la mortalidad.<sup>1</sup> En Estados Unidos de América (EUA) se reportan pérdidas por cerca de 700 millones de dólares por problemas respiratorios anualmente siendo las principales enfermedades reportadas la pasteurelosis neumónica bovina, la neumonía enzoótica de los bovinos y la neumonía intersticial atípica.<sup>2</sup>

El complejo respiratorio bovino es una enfermedad de etiología multifactorial, los organismos más comúnmente involucrados son agentes virales como el Herpes virus-1, Virus Sincitial Bovino, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Parainfluenza-3, Adenovirus, Coronavirus, y agentes bacterianos como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis* y *Arcanobacterium pyogenes*.<sup>1</sup> Los agentes virales causan un efecto citopático directo en el aparato respiratorio además de que reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar lo que facilita la colonización pulmonar por *Pasteurella spp.*<sup>3,4</sup>

*M. haemolytica* es el principal agente etiológico bacteriano en neumonías de rumiantes, causando grandes pérdidas económicas debido a la mortalidad que ocasiona, a los efectos negativos sobre la ganancia de peso y sobre la eficiencia en la conversión alimenticia de los animales, así como al costo de los tratamientos para su control.<sup>5</sup> El impacto más grande se da al destete de becerros, en animales recientemente transportados, al mezclar animales de diferentes orígenes y tras otros manejos estresantes.<sup>4,6</sup>

Esta bacteria forma parte de la flora normal oportunista del tracto respiratorio superior y se aloja en la nasofaringe y en las criptas de las tonsilas de rumiantes; sin embargo, bajo ciertas condiciones como situaciones estresantes, inmunosupresión, cambios bruscos de temperatura, humedad relativa elevada, hacinamiento e infecciones virales; se multiplica y coloniza el tracto respiratorio inferior pudiéndose asociar con otras bacterias como *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*.<sup>1,6</sup> Después de un periodo de incubación de 2 a 14 días, el resultado es una pleuroneumonía fibrinosa aguda la cual se manifiesta con signos como fiebre, depresión, aumento de la frecuencia respiratoria, descarga nasal y, en casos severos, la muerte; en estos casos las lesiones encontradas en la necropsia a nivel del pulmón son áreas de consolidación con necrosis central y hemorragia en la periferia, así como una pleuritis fibrinosa; mientras que los estudios histopatológicos muestran áreas multifocales de bronconeumonía fibrino-hemorrágica aguda con necrosis coagulativa, pleuritis fibrinosa y congestión capilar.<sup>6,7</sup>

## **1.2 CARACTERÍSTICAS DE *Mannheimia haemolytica***

Este microorganismo pertenece a la familia Pasteurellaceae la cual incluye a los géneros *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Lonepidella*.<sup>8</sup> A través del tiempo ha pasado por varias clasificaciones; en 1885 fue nombrada *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt. Más tarde, en 1896, Flugge lo modificó a *Bacillus bovisseptica* y en 1932, Newson y Cross, la renombraron *Pasteurella haemolytica* debido a la débil hemólisis observada en las cajas de agar de sangre de ovino. Inicialmente estaba clasificada en 16 serotipos basados en pruebas de hemoaglutinación indirecta de extracción de antígenos capsulares; sin embargo, Smith la dividió en 2 biotipos: A y T, con base en su capacidad para fermentar la trealosa y la arabinosa respectivamente,



identificándose 12 serotipos A y 4 serotipos T. En 1990, a partir de estudios de hibridación de ADN-ADN, análisis genéticos y características bioquímicas, se reclasificaron los serotipos del biotipo T (T3, T4, T10 y T15), como una especie separada nombrándola *Pasteurella trehalosi*, siendo esta recientemente reclasificada a *Bibersteinia trehalosi* y en 1995 Younan y Fodor identificaron un nuevo serotipo, el A17.<sup>1,8</sup>

En 1999, Angen *et al*, mediante estudios de ribotipificación, electroforesis de enzimas multi-locus, secuenciación del gene 16S del RNAr e hibridación de ADN-ADN, reclasificaron los serotipos A de *Pasteurella haemolytica* (A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 y A17) en un nuevo género llamado *Mannheimia*, quedando los anteriores serotipos A de *P. haemolytica* como *Mannheimia haemolytica* y el serotipo A11 fue renombrado como *Mannheimia glucosida*.<sup>1,8</sup>

Con esta nueva clasificación, en el género *Mannheimia* quedaron incluidas las siguientes especies: 1) *M. haemolytica*, donde están los serotipos A de *P. haemolytica*; 2) *M. granulomatis*, están incluidas las cepas anteriormente llamadas *P. granulomatosis*, Bisgaard taxón 20 y *P. haemolytica* biotipo 3J, así como las cepas clasificadas como *P. haemolytica*-like; 3) *M. glucosida*, incluye cepas anteriormente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos 3 A-H y 9, y el serotipo 11 con todas sus cepas. 4) *M. ruminalis*, incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii* y *P. haemolytica* biogrupo 3j; y finalmente 5) *M. varigena*, incluye cepas clasificadas como *P. haemolytica* biogrupo 6 y bisgaard taxon 15 y 36.<sup>1, 8, 9, 10.</sup>

La neumonía en bovinos se asocia principalmente a los serotipos A1 y A6 de *M. haemolytica*, y en ovinos al serotipo A2.<sup>1,6</sup> En Estados Unidos de América se han encontrado porcentajes de 60-70% para el serotipo A1, 26-31% para el A6 y de 7-11% para el A2 en aislamientos provenientes de pulmones neumónicos en bovinos de diferentes partes del país.<sup>11,12</sup>

Estudios realizados en México durante los años 80 y 90, muestran porcentajes variables de los serotipos aislados de pulmones neumónicos, encontrando al serotipo A1 como el más frecuentemente aislado en bovinos y al A2 como el más frecuente en ovinos.<sup>5,13,14</sup> Recientemente se han reportado en exudados de bovinos productores de leche, aislamientos del serotipo A1 en porcentajes de entre 26.2-48%, de 2.4-5% para el serotipo A6 y de 50.1-66% para cepas no tipificables; y en pulmones neumónicos se obtuvieron aislamientos de 33% para A1, 17.6% para A6 y 49% para cepas no tipificables.<sup>15,16,17</sup>

*M. haemolytica* es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no móvil, no produce esporas, es de forma cocobacilar o de bacilo pequeño pleomórfico, mesofílica, aerobia o anaerobia facultativa y presenta tinción bipolar. Crece mejor en presencia de sangre o suero a una temperatura de 35 a 37°C, observando colonias claras de aproximadamente 1 mm de diámetro, lisas o mucoides. En agar con sangre de bovino se puede observar una  $\beta$  hemólisis en la mayoría de las cepas; *M. haemolytica* también puede crecer en agar McConkey y agar chocolate.<sup>4,8</sup>

En cuanto a sus características bioquímicas, es oxidasa positiva e indol, ureasa y citrato negativa; fermenta la glucosa y otros carbohidratos pero no produce gas, también fermenta manitol, D-sorbitol, D-xilosa, maltosa y dextrina.<sup>4,8</sup>

### **1.3 FACTORES DE VIRULENCIA**

*M. haemolytica* cuenta con varios factores de virulencia que le permiten evadir las defensas del organismo huésped y le facilitan la colonización del pulmón, entre estos se encuentran una cápsula, lipopolisacárido (LPS), glucocalix, proteínas reguladas por hierro

(PRH), fimbrias, adhesinas, proteínas de la membrana externa (PME), enzimas proteolíticas, plásmidos de resistencia a antibióticos y una leucotoxina (Lkt).<sup>6,7,9</sup>

La cápsula se produce durante la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria, la protege de la fagocitosis y de la actividad bactericida, además puede interactuar con el surfactante pulmonar facilitando la adherencia a las células huésped.<sup>7</sup>

El LPS es uno de los componentes con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria; como toda endotoxina de Gram negativa tiene actividad pirogénica, de activación de macrófagos, inducción del factor de tumoración, activación de la cascada de coagulación, agregación de plaquetas e inducción del choque endotóxico. Así mismo interviene en la respuesta de anticuerpos, en la protección antibacteriana y en adhesión a las células huésped.<sup>4, 7</sup> Se ha observado que el LPS tiene un efecto apoptótico directo sobre el endotelio alveolar de los pulmones de bovino y aumenta la actividad de la leucotoxina formando un complejo LPS-LKT .<sup>1, 18, 19</sup>

El glucocalix participa en la adhesión de *M. haemolytica* a los leucocitos y en causar un efecto citolítico en ellos.<sup>7</sup> Las proteínas reguladas por hierro se unen al hierro disponible y facilitan el crecimiento de la bacteria; <sup>6, 9</sup> las fimbrias están involucradas en la adhesión bacteriana durante la fase inicial de colonización en el tracto respiratorio superior y las adhesinas se encargan del reconocimiento y la unión a receptores de las células blanco.<sup>7</sup>

La función de las proteínas de la membrana externa (PME) no está bien definida, sin embargo tiene una participación potencial en la respuesta de anticuerpos, en la protección antibacteriana y en la adhesión a los leucocitos. Son unos de los más importantes antígenos para estimular la respuesta inmune y potenciales inmunógenos para el desarrollo de vacunas, observándose variaciones inmunogénicas entre los diferentes serotipos de *Mannheimia haemolytica*.<sup>4,7,20</sup>

Entre las enzimas proteolíticas presentes se encuentra la sialoglicoproteasa (Gcp) la cual no se sabe exactamente como participa en el daño al pulmón, pero es uno de los antígenos encontrados en el sobrenadante de cultivos de *M. haemolytica*. Tiene actividad de endopeptidasa y neuraminidasa por lo que puede fraccionar glicoproteína A tipo mucina en diferentes sitios. Se ha comprobado su inmunogenicidad y su producción *in vivo* por parte de *M. haemolytica* en estudios realizados en becerros.<sup>4,7,21</sup>

La neuraminidasa es otra de estas enzimas, ésta es una metaproteasa neutra de 35kDa la cual alcanza su máximo pico de producción en la fase de crecimiento estacionaria y participa en la remoción de las glicoproteínas de la superficie celular o del moco, facilitando la adherencia de *M. haemolytica*.<sup>4</sup> Se ha encontrado que todos los serotipos de *M. haemolytica* excepto el A11, son capaces de producir esta enzima.<sup>4,22</sup>

En los últimos años se ha observado un aumento en la resistencia de *M. haemolytica* a un gran número de antibióticos, demostrándose la presencia de al menos un plásmido de resistencia a antibióticos en la mayoría de las cepas de *M. haemolytica*; sin embargo, también se ha encontrado resistencia en cepas con ausencia de estos plásmidos. Uno de los más frecuentes es el de resistencia a sulfonamidas aunque también se ha encontrado plásmidos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, estreptomina, kanamicina, tetraciclinas y cloranfenicol.<sup>1, 4, 23</sup>

### **1.3.1 LEUCOTOXINA**

La leucotoxina de *M. haemolytica* es una toxina calcio dependiente la cual es producida durante la fase logarítmica de crecimiento de la bacteria y es considerada su principal factor de virulencia, ya que tiene actividad específica contra leucocitos de rumiantes y es

la principal causante del daño al pulmón.<sup>7,24</sup> Esto ha sido comprobado en estudios realizados previamente, en donde se expusieron animales a cepas mutantes de *M. haemolytica* carentes de leucotoxina pero con todos los demás factores de patogenicidad, encontrando que la mortalidad y el daño al pulmón fue mucho menor que en los animales expuestos a cepas silvestres de *M. haemolytica*.<sup>25</sup> Así mismo, Morales en el 2004 detectó por métodos inmunohistoquímicos, la presencia de la leucotoxina en pulmones de corderos con lesiones de neumonía, lo que refuerza su importancia en el daño al pulmón.<sup>26</sup>

Esta toxina es producida y secretada por todas sus cepas, aunque puede observarse una variación en la cantidad secretada o producida entre cada una de ellas;<sup>1</sup> su efecto tóxico es específico contra leucocitos de rumiantes, especialmente contra las células polimorfo nucleares uniéndose a los receptores de las  $\beta_2$  integrinas. Pertenece a la familia de las toxinas RTX (Repeats-in-toxin), esta familia está formada por toxinas de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; las cuales comparten un sistema de síntesis y secreción similares y tienen actividades biológicas relacionadas, aunque con una marcada diferencia en la especificidad de las células blanco; las toxinas secretadas por *E. coli* y *A. pleuropneumoniae* tienen actividad contra eritrocitos y contra una gran variedad de células nucleadas incluyendo leucocitos de diferentes especies; por el contrario, las toxinas de *A. actinomycetemcomitans* tienen especificidad por leucocitos de primates y las de *M. haemolytica* por los leucocitos de rumiantes.<sup>27,28</sup>

La leucotoxina es el producto de un operón constituido por los genes *lktC, A, B* y *D*; en donde el gen *lktA* codifica la estructura de la pretoxina, el gen *lktC* codifica una proteína que activa a la toxina y los genes *lktB* y *lktD* codifican las proteínas que se encargan de la secreción de la toxina.<sup>1,28</sup> Entre los leucocitos, los macrófagos son más resistentes a la

acción de la toxina que los neutrófilos, a su vez los macrófagos alveolares de bovinos adultos resisten más que los macrófagos alveolares de becerros menores a 16 semanas de edad. Existe evidencia que indica que la movilización de neutrófilos para combatir la infección es ineficaz y por el contrario, contribuye al desarrollo de las lesiones en el pulmón.<sup>1</sup>

Su actividad es dosis-dependiente, a bajas concentraciones causa la muerte celular mediante apoptosis mientras que a altas concentraciones, la muerte es causada por oncosis. En concentraciones altas (1,000-2,000 moléculas de toxina por célula) daña a la célula insertándose en su membrana e induciendo la formación de poros de 0.9 a 3 nm de diámetro, provocando la salida del potasio intracelular y la incorporación de calcio extracelular lo que da como resultado el hinchamiento y lisis de la célula. A muy bajas concentraciones provoca la interrupción de la respiración y la degranulación de los leucocitos liberando eicosanoides y citoquinas.<sup>29</sup>

### **1.3.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LEUCOTOXINA**

Dentro de las técnicas más usadas para la detección de la leucotoxina de *M. haemolytica* se encuentran el Western blot<sup>30,31</sup>, la citometría de flujo<sup>3,32</sup> y la observación de las alteraciones provocadas en leucocitos expuestos a la leucotoxina a través del microscopio electrónico de barrido.<sup>32,33</sup>

Para su cuantificación, se encuentra el método de liberación de <sup>51</sup>Cromo en el cual se utilizan neutrófilos marcados con <sup>51</sup>Cromo los cuales son incubados en microplacas de 96 pozos en las que se realizan previamente diluciones dobles de sobrenadantes de *M. haemolytica* ; posteriormente se cuantifica la cantidad de <sup>51</sup>Cr con un contador gamma,

siendo el punto de corte la mayor dilución de sobrenadante en la que se obtiene una liberación del cromo de al menos el 50% del total liberado en el control.<sup>34,35,36,37</sup>

Otro método es el de exclusión de azul tripán en el cual también se realizan diluciones dobles de sobrenadantes de *M. haemolytica* en microplacas de 96 pozos, se agregan neutrófilos y se incuban, posteriormente se adiciona azul de tripán y se cuentan las células viables con ayuda del hemocitómetro. La presencia de leucotoxina se evalúa de acuerdo al porcentaje de células destruidas del total agregado en un principio.<sup>31,38,39,40</sup>

El siguiente método es la medición de la enzima lactato deshidrogenada (LDH), para lo cual ha sido frecuentemente utilizada la línea celular de linfoma de bovino BL3, estas células se resuspenden en medio RPMI 1640 y se exponen a diferentes concentraciones del sobrenadante de *M. haemolytica*, se centrifuga y se mide la LDH presente en el sobrenadante obtenido.<sup>30, 33, 41, 42</sup>

La medición de la respuesta quimioluminiscente luminol-dependiente de neutrófilos de rumiante estimulados con zymosan opsonizado es otro método utilizado. En este se realizan en una placa diluciones dobles seriadas de los sobrenadantes de *M. haemolytica* con neutrófilos suspendidos en Hanks's HEPES y DNDH, se incuban y posteriormente se estimulan con zymosan opsonizado; la quimioluminiscencia resultante se mide con un luminómetro conectado a una PC.<sup>43,44, 45</sup>

La técnica de ELISA indirecta también se ha usado para cuantificar leucotoxina;<sup>16,26,43,46,47,48</sup> sin embargo, para su realización no existen kits comerciales y se necesitan producir previamente anticuerpos antileucotoxina y obtener leucotoxina purificada, además de que no ha sido estandarizada.<sup>26, 46</sup>

Por último, está el ensayo visual simple; esta es una prueba rápida, simple y barata que no necesita equipo especializado para su lectura y permite trabajar con 6 sueros

diferentes en una misma microplaca de titulación. Consiste en exponer leucocitos frescos de rumiante, obtenidos mediante choque hipotónico con agua destilada, a la leucotoxina a probar y realizar diluciones dobles; pasado un tiempo de incubación se fija con formol al 10 % y se tiñe con cristal violeta al 1%. El fundamento de esta prueba se basa en la capacidad de la leucotoxina de *M. haemolytica* para lisar los leucocitos de la sangre periférica de rumiante; por lo que el observar un fondo azul significa que no hay producción de leucotoxina por que están presentes células teñidas en el pozo, mientras que en un fondo claro no existe un sustrato que teñir ya que la presencia de la leucotoxina provocó la lisis de estas células.<sup>26, 49, 50, 51, 52, 53</sup>

Otros métodos usados en menor frecuencia son la medición de formazán, el cual es el resultado de la reducción de tetrazolio MTT por parte de las células viables por lo que su cantidad está directamente relacionada con el número de presente de estas;<sup>52,53</sup> el ensayo de reducción de nitroazul de tetrazolio NBT a formazán<sup>54</sup> y el ensayo de rojo neutro en el que se utiliza este colorante para medir la viabilidad celular después de exponer leucocitos a la leucotoxina.<sup>55,56,57</sup>

## **1.4 CONTROL Y PREVENCIÓN**

Debido a la etiología multifactorial del complejo respiratorio bovino, es improbable que una sola estrategia sea completamente efectiva para el control de la enfermedad; dentro de las medidas preventivas se debe considerar evitar situaciones y factores estresantes, así como controlar las condiciones medioambientales y proveer de una nutrición adecuada a los animales.<sup>6, 58</sup>



En cuanto a la vacunación, han sido manufacturadas diversas vacunas para su prevención, sin embargo existen pocos estudios con desafíos controlados que demuestren la eficacia de estas vacunas.<sup>2</sup> Las bacterinas disponibles comercialmente son frecuentemente usadas, a pesar de que los resultados en el control de la enfermedad son decepcionantes, incluso contraproducentes, siendo éstos atribuidos a la ausencia de la leucotoxina en su preparación.<sup>59,60</sup> Muchos de los estudios realizados coinciden en que la leucotoxina tiene un papel primordial en el desarrollo de un inmunógeno eficaz, debido a que niveles altos de anticuerpos antileucotoxina han sido correlacionados con una mayor resistencia a la enfermedad, encontrándose que en presencia de éstos el daño pulmonar es menor.<sup>23,28,59</sup> A pesar de que se ha demostrado que una vacuna conteniendo leucotoxina sola o recombinante confiere una mayor protección para los animales, esta protección no es suficiente lo que sugiere que el uso de la leucotoxina debe estar acompañado por otros antígenos del sobrenadante.<sup>23, 60, 61</sup>

## **2 JUSTIFICACIÓN.**

El complejo respiratorio bovino causa pérdidas económicas importantes en todo el mundo en las producciones bovinas debido, entre otros, a los costos de su tratamiento, los cuales se han incrementado por la continua resistencia a los quimioterapéuticos, la pérdida de peso, la conversión alimenticia ineficiente y el retraso en el ciclo productivo de los animales enfermos, así como la mano de obra adicional, los decomisos en rastro y la menor producción de carne.<sup>1,3</sup>

En estudios previos realizados entre el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-Microbiología) de el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y la Facultad de Medicina Veterinaria y

Zootecnia (FMVZ), como parte del proyecto CONACyT G-38590-B “Bases moleculares de la patogenia de enfermedades causadas por *Pasteurella* y *Actinobacillus* en rumiantes y cerdos, para su prevención”, se obtuvieron aislamientos de *M. haemolytica* en exudado nasal de bovinos productores de leche; estos aislamientos proceden de dos complejos ubicados en Tizayuca, Hidalgo y la Región Lagunera, en los estados de Coahuila y Torreón.<sup>15,16,17</sup>

Siendo *M. haemolytica* el organismo más frecuentemente aislado de las neumonías en bovinos y considerando que la leucotoxina es el factor de virulencia más importante de *M. haemolytica* y que en diferentes estudios se ha comprobado su eficacia como inmunógeno,<sup>3,59,60</sup> resulta de gran importancia constatar la capacidad de dichos aislamientos para producir el citado metabolito y así poder contribuir a encontrar una vacuna eficaz para el control de la enfermedad.

### **3 HIPÓTESIS.**

Los aislamientos de *M. haemolytica* obtenidos de exudados nasales de bovinos sanos y neumónicos tienen la capacidad de producir leucotoxina.

### **4 OBJETIVO GENERAL.**

Determinar mediante la prueba de ensayo visual simple, la capacidad de producción de leucotoxina en aislamientos de *M. haemolytica* provenientes de exudados nasales de bovinos sanos y enfermos de neumonía.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Determinar mediante la prueba de ensayo visual simple la capacidad de producción de leucotoxina en aislamientos de *M. haemolytica*.

Realizar una aproximación a la cuantificación de la producción de leucotoxina en aislamientos de *M. haemolytica* de acuerdo a la máxima dilución en la que se observa su efecto.

## **5 MATERIAL Y MÉTODOS.**

**5.1 MATERIAL BIOLÓGICO.** Se utilizaron 71 aislamientos de *M. haemolytica* A1 obtenidos de exudados nasales de bovinos productores de leche sanos (n=40) y enfermos de neumonía (n=31). Las cepas fueron identificadas y caracterizadas en estudios previos que se realizaron en el CENID-Microbiología del INIFAP y en la FMVZ de la UNAM, por medio de técnicas bioquímicas e inmunológicas convencionales.<sup>15,16,17</sup>

**5.2 RECUPERACIÓN DE CEPAS Y PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA.** Se cultivaron los diferentes aislamientos de *M. haemolytica* por separado en placas agar sangre, se incubaron a 37°C por 18 horas para posteriormente ser cosechadas y cultivadas en frascos para vacuna de 50 ml con RPMI 1640 adicionado con 7% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37°C en movimiento constante por 4 horas; después de este tiempo se centrifugó por 5 minutos, el sobrenadante se etiquetó como “1er sobrenadante” y el paquete bacteriano fue resuspendido nuevamente en medio RPMI 1614 fresco por 2 horas, momento en el cual la bacteria alcanza su fase logarítmica de crecimiento, que es detectada por el cambio de color del medio el cual se torna amarillo y de apariencia turbia;

y es en donde se da la mayor producción de leucotoxina. Nuevamente se centrifugó la suspensión a 3000 x g por 5 minutos, el paquete celular fue desechado y el sobrenadante se etiquetó como “2do sobrenadante”; al igual que el 1er sobrenadante se congeló hasta el momento en que fueron utilizados en la prueba de ensayo visual simple.<sup>26</sup>

**5.3 OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS.** Se utilizó sangre periférica de ovino obtenida con tubos al vacío conteniendo heparina como anticoagulante. A la sangre se le agregó 20 ml de agua destilada por 30 segundos lo que provocó un choque hipotónico que lisó los eritrocitos. Posteriormente se añadió la misma cantidad de PBS concentrada a 2x para detener la lisis eritrocítica y se centrifugó a 800 x g por 5 minutos. Se realizó un segundo lavado de la misma forma que el primero, pero exponiendo las células solamente por 20 segundos al agua destilada para obtener el paquete globular blanco libre de eritrocitos. Este paquete globular blanco se resuspendió en medio RPMI-1640.<sup>26</sup>

**5.4 ENSAYO VISUAL SIMPLE PARA LA DETECCIÓN DE LEUCOTOXINA.** Esta prueba consistió en realizar diluciones dobles, en microplacas de titulación de 96 pozos de fondo plano, de los sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* obtenidos a la 4 h (1er sobrenadante) y 6 h (2do sobrenadante) de incubación; posteriormente se adicionaron 100µl de una suspensión de leucocitos obtenida mediante choque hipotónico, se incubaron durante 1 hora a 37°C y se centrifugaron a 800 x g por 5 min. Posteriormente se le adicionó a cada pozo de las microplacas solución salina amortiguada formalinizada al 10 % y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Después de este tiempo, se procedió a teñir los pozos con una solución de cristal violeta al 1% durante 10 min; por último, se lavó con agua corriente y se observó el color producido en el fondo de los

pozos. Un pozo claro indicó la presencia de leucotoxina y un fondo azul, su ausencia. La aproximación a la cuantificación de la capacidad de producción de leucotoxina se dio de acuerdo a la máxima dilución en la que se observó el efecto sobre los leucocitos.<sup>25, 26, 36, 37,</sup>

38

**5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.** Los datos obtenidos en el ensayo visual simple se transformaron a logaritmo base 2 ( $\text{Log}_2$ ) y posteriormente fueron ingresadas en el programa estadístico SAS, en donde se realizó análisis de varianza para comparar los resultados de animales sanos con los de enfermos. Así mismo, se determinó la probabilidad de producción de leucotoxina entre los aislamientos de bovinos enfermos y los de bovinos sanos, mediante el cálculo de la razón de momios.

## **6 RESULTADOS.**

### **6.1 CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA Y APROXIMACIÓN A SU CUANTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *Mannheimia haemolytica*.**

Se detectó la presencia de leucotoxina en el 70% (50/71) del total de cepas estudiadas; de éstas, el 44% (22/50) pertenecían a bovinos sanos y el 56% (28/50) a bovinos enfermos con cuadro respiratorio. Así mismo, se detectó la leucotoxina en el 55% (22/40) de las cepas de los bovinos sanos y en el 90% (28/31) de las de los enfermos (Cuadro 1). De las 21 cepas en donde no se detectó producción aparente de leucotoxina, 18 correspondieron a exudados de bovinos sanos y 3 a enfermos.

Se encontró diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en la producción de leucotoxina entre los aislamientos de animales enfermos y la de los sanos. Las cepas provenientes de exudados nasales de animales sanos tuvieron menor capacidad de producción de

leucotoxina que las cepas provenientes de exudados nasales de animales enfermos tanto a las 4 hrs (Fig.1), como a las 6 hrs (Fig.2). De igual manera, la media de los sobrenadantes obtenidos a las 6hrs fue mayor que la de los obtenidos a las 4 hrs independientemente del estado de salud de los animales (Fig. 3). El título más alto encontrado en los sobrenadantes de cepas de animales sanos obtenidos a las 6 hrs fue de 1:2, mientras que en las de animales enfermos fue de 1:4.

Por otro lado, se encontró que la probabilidad de producción de leucotoxina en cepas provenientes de animales enfermos fue significativamente mayor que en cepas de animales sanos (RM= 7.64, IC<sub>95%</sub> = 1.78-37.6).

## CUADRO 1

**CEPAS DE *Mannheimia haemolytica* CON PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA EN LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE.**

---

---

	CEPAS	(+) LEUCOTOXINA
<b>Sanos</b>	<b>40</b>	<b>22</b>
Fila %		55%
Columna %		44%
<b>Enfermos</b>	<b>31</b>	<b>28</b>
Fila %		90.3%
Columna %		56%
<b>TOTAL</b>	<b>71</b>	<b>50</b>
%		70%

---

---

**Figura 1.**

**APROXIMACIÓN A LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA EN AISLAMIENTOS DE *M. haemolytica* PROVENIENTES DE EXUDADOS NASALES DE BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE MEDIANTE LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE DE SOBRENADANTES A LAS 4 HRS DE INCUBACIÓN.**

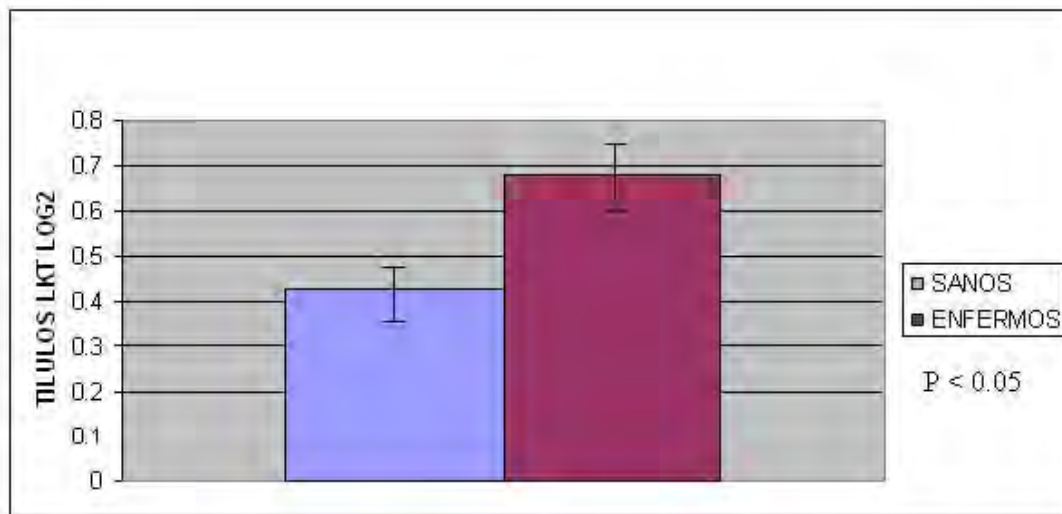




Figura 2.

APROXIMACIÓN A LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA EN AISLAMIENTOS DE *M. haemolytica* PROVENIENTES DE EXUDADOS NASALES DE BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE MEDIANTE LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE DE SOBRENADANTES A LAS 6 HRS DE INCUBACIÓN

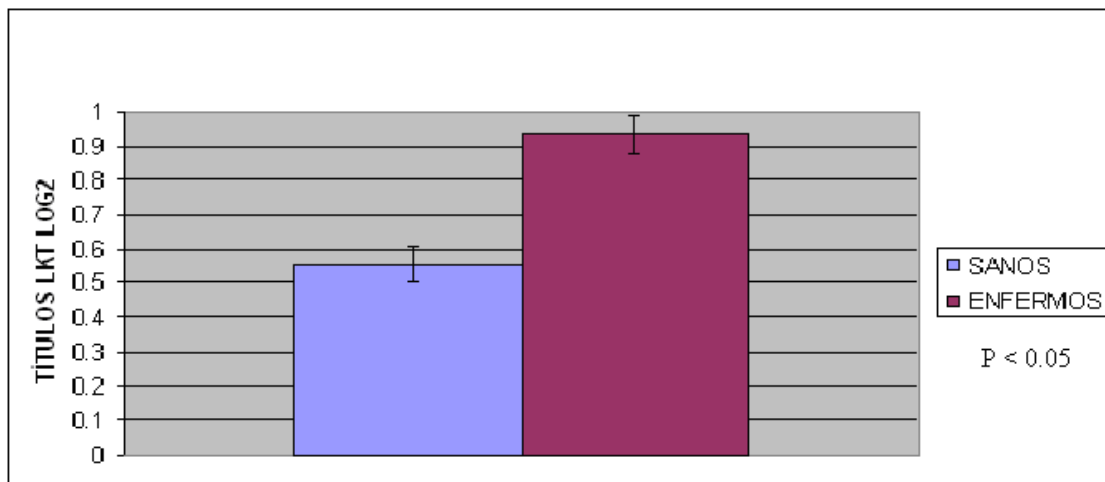
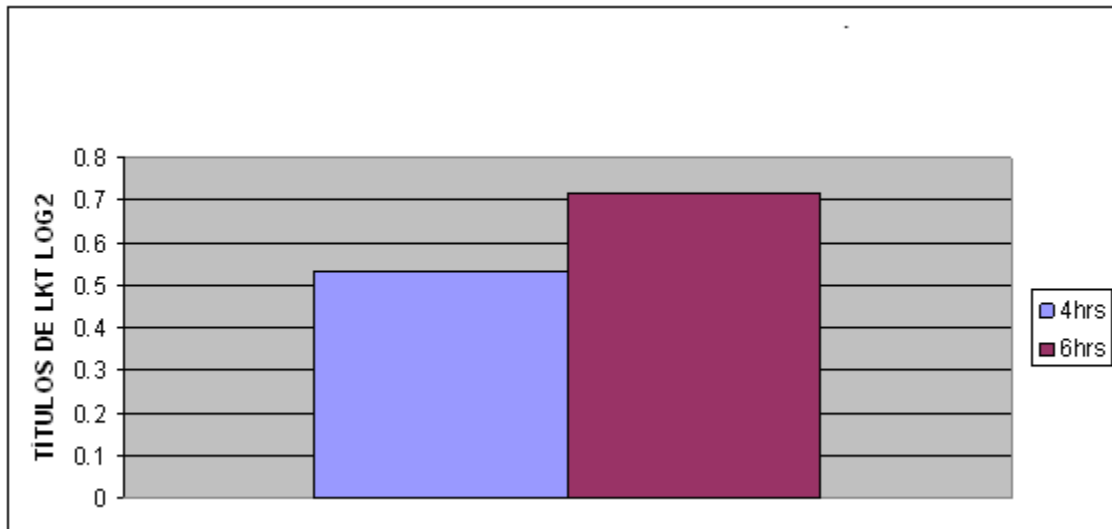


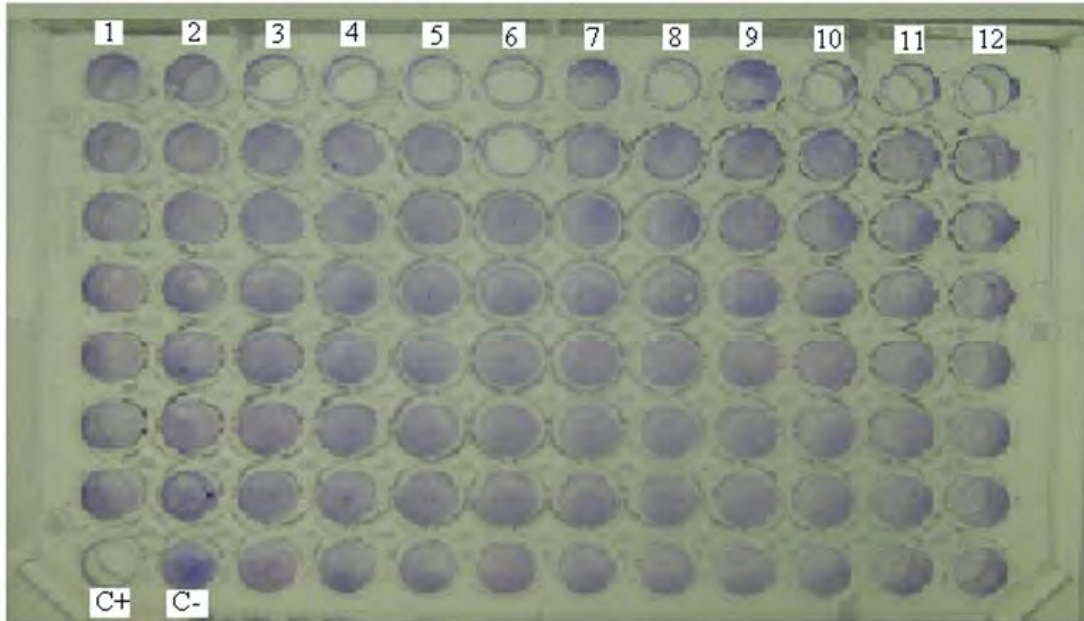
Figura 3.

PRODUCCIÓN DE LEUCOTOXINA EN AISLAMIENTOS DE *M. haemolytica* A LAS 4 Y 6 HRS DE INCUBACIÓN, INDEPENDIENTEMENTE DE SU ESTADO DE SALUD, EN LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE.



**Figura 4.**

**LECTURA DE LA PRUEBA DE ENSAYO VISUAL SIMPLE.**



Las dos primeras columnas corresponden a un resultado negativo a la producción de leucotoxina. La tercera y cuarta columna muestran una reacción positiva hasta la dilución 1:2 y la sexta columna hasta 1:4. En la parte inferior izquierda se encuentran el control positivo (C+) y el negativo (C-).

## 7 DISCUSIÓN.

La enfermedad respiratoria causada por bacterias del género *Pasteurella* es una de las más costosas para la producción bovina, siendo considerada la enfermedad económicamente más importante en bovinos de carne y la segunda, después de las enfermedades gastrointestinales, en becerras de leche.<sup>4,62</sup> Es una de las principales

causas de mortalidad y morbilidad en becerras de Estados Unidos de América y Canadá y aproximadamente el 25% de los becerros pasan por un episodio de enfermedad respiratoria durante el primer año de vida.<sup>1,4,11</sup>

*Mannheimia haemolytica* es la bacteria más comúnmente presente en las enfermedades respiratorias de bovinos,<sup>1,6</sup> la actividad leucotóxica de su toxina ha sido detectada en varios trabajos utilizando diversos métodos para determinar su presencia y/o cuantificar su actividad siendo los medios de cultivo más usados para la obtención de leucotoxina el RPMI 1640 y el caldo infusión cerebro corazón (BHI) suplementados con suero fetal bovino o albúmina<sup>47</sup>. Sin embargo, la actividad leucotóxica se ha determinado generalmente en una o en poco número de cepas y escasos trabajos realizan una comparación entre cepas aisladas de animales enfermos con sanos.<sup>26,43,44</sup>

Dentro de las desventajas de los métodos usados para la cuantificación de leucotoxina están los altos costos y la difícil accesibilidad a algunos materiales utilizados; la necesidad de contar con equipo especializado, lo laborioso que puede ser su realización y la cantidad de sueros que se pueden probar en un mismo tiempo. Por el contrario, el ensayo visual simple es una prueba rápida, simple y barata que no necesita equipo especializado para su lectura y permite trabajar con 6 sueros diferentes en una misma microplaca de titulación. Al ser una prueba visual está sujeta a la interpretación de quien la realiza por lo que su sensibilidad es baja, pero nos permite observar las diferencias en la producción de leucotoxina de diferentes cepas de una manera rápida y fácil en comparación con otros métodos y con resultados comparables, lo que es práctico sobre todo cuando se desea trabajar con un considerable número de cepas.<sup>26,49</sup>

El ensayo visual simple también ha sido usado para determinar la actividad neutralizante de anticuerpos contra la leucotoxina siendo especialmente útil para evaluación de la protección de alguna vacuna o bacterina contra la leucotoxina ya que se ha encontrado

una correlación directa entre títulos neutralizantes contra la leucotoxina con la resistencia a la neumonía por *M. haemolytica*.<sup>49,51,59</sup>

En un estudio comparativo entre tres diferentes métodos siendo estos la liberación de <sup>51</sup>Cr, la exclusión de azul de tripán y el ensayo visual simple para determinar la capacidad de suero bovino para neutralizar la leucotoxina, se encontraron que los resultados obtenidos con el ensayo visual simple fueron comparables con los obtenidos en los otros métodos y con grandes ventajas sobre los otros dos al ser menos laboriosa, poderse realizar en menor tiempo y trabajar un mayor número de muestras al mismo tiempo, además de que no necesita usar material radioactivo ni equipo especializado por lo que puede realizarse en un gran número de laboratorios.<sup>49</sup>

En el 2004, Morales<sup>26</sup> determinó los títulos de leucotoxina mediante el ensayo visual simple en cepas de *M. haemolytica* aisladas a partir de pulmones neumónicos y de exudado nasal de corderos sanos, encontrando mayor producción de leucotoxina en aislamientos de cepas de animales enfermos comparadas con las de animales sanos, lo que corresponde a lo observado en este trabajo; sin embargo en ese trabajo el título alcanzado en cepas de animales sanos fue de 1:8 y de 1:32 para las de origen neumónico, estos valores están muy por encima de los títulos encontrados en el presente trabajo en donde el título más alto para animales sanos fue de 1:2 y para enfermos 1:4.

Existen diversas condiciones de crecimiento y muestreo que se ha comprobado afectan la producción de leucotoxina como son la temperatura, el pH, la composición del medio, la tasa de crecimiento y el tiempo de cosechado. Se ha encontrado que las mayores tasas de crecimiento de *M. haemolytica* se dan a una temperatura de entre 37-40°C y con un pH de 6.8-7.8, además de que la adición de nutrientes como cisteína, glutamina, hierro y manganeso estimulan la producción de leucotoxina.<sup>47,48, 63</sup>

El operón de la leucotoxina de *M. haemolytica* contiene cuatro genes (*lktABCD*); la leucotoxina es secretada en una forma inactiva (*prolktA*) que es activada por acilación del gene *lktC*, lo cual es esencial para el efecto biológico de la leucotoxina, pero no es requerido para su transporte al medio externo ya que los genes *lktB* y *lktD* son los encargados de tal función.<sup>4,28</sup> Fedorova y Highlander<sup>41</sup>, crearon una cepa mutante de *M. haemolytica* con inserciones en el gen *lktC*, la cual secretaba *prolkt* antigénica pero sin actividad leucotóxica ni hemolítica ; Tatum *et al.*<sup>64</sup> también generaron una cepa mutante que era incapaz de secretar leucotoxina debido a la supresión del gene *lktA*. En el presente trabajo se encontraron cepas sin aparente producción de leucotoxina, la ausencia de alguno de los genes que la codifican o la falta de expresión de éstos afectarían la detección de su actividad leucotóxica, por lo que posteriores estudios moleculares de las cepas utilizadas serían necesarios para determinar su relación con los títulos encontrados como se ha hecho con cepas mutantes no productoras de leucotoxina.<sup>25</sup>

Por otro lado, Morales<sup>26</sup> encontró mediante el método de ELISA Indirecta, menor capacidad de producción de leucotoxina a la 6 h de incubación que a la 4 h; mientras que en las cepas trabajadas en esta tesis, se observó mayor producción de leucotoxina a la 6 h que a las 4 h lo que coincide a lo reportado por diversos autores en cuanto a que la mayor producción de leucotoxina se da en la fase de crecimiento logarítmica de la bacteria.<sup>34, 37, 41, 43</sup>

Los serotipos A1 y A6 de bovino están exclusivamente asociadas a un solo tipo de leucotoxina: la *lktA1.1*; mientras que las cepas serotipo A1, A5-A9 y A12 de ovino están asociadas a los tipos de leucotoxina *lktA1.2* y *lktA1.3*; estas últimas, a pesar de estar estrechamente relacionadas a las cepas A1 y A6 de bovino, son genéticamente

diferentes, difiriendo de *lktA1.1* por una sustitución de ácido aspártico con asparagina en la posición 841.<sup>44, 65</sup>

Davies y Baillie<sup>44</sup> encontraron producción y presencia de leucotoxina en los sobrenadantes de las 32 cepas de *M. haemolytica* con las que trabajaron, aunque con diferencias en la cantidad secretada. Ellos midieron la actividad leucotóxica por medio de quimioluminiscencia y observaron que cepas provenientes de bovino (*lktA1.1*) tuvieron la misma actividad leucotóxica contra neutrófilos de ovino que contra los de bovino; mientras que en cepas provenientes de ovinos (*lktA1.2* y *lktA1.3*) se observó mayor actividad leucotóxica contra los neutrófilos de ovino que contra los de bovino.<sup>12</sup> La leucotoxina tipo *lktA1.1* de bovino fue generalmente más activa en contra de leucocitos de bovino que las leucotoxinas tipo *lktA1.2* y *lktA1.3* de ovino indicando que las leucotoxinas asociadas a bovino y ovino difieren en su citotoxicidad en contra del mismo tipo de célula y que los neutrófilos de ovino son más sensibles a la actividad citotóxica que los neutrófilos de bovino.<sup>12</sup> En el presente trabajo se utilizaron leucocitos de ovino para medir la actividad leucotóxica de cepas de bovino debido a su disponibilidad, pero de acuerdo a los datos descritos arriba, se esperaba haber obtenido los mismos resultados si se hubiesen utilizado leucocitos de bovino.

En otro estudio realizado por Saadati *et al*,<sup>43</sup> se investigaron en 33 cepas de diferentes serotipos de *M. haemolytica* las diferencias en la actividad leucotóxica de aislamientos de bovinos y ovinos, sanos y enfermos utilizando ELISA y quimioluminiscencia. Ellos utilizaron caldo BHI para obtener la leucotoxina y encontraron que los sobrenadantes de cepas de bovino fueron estadísticamente menos tóxicos a los neutrófilos que los aislamientos de ovinos, siendo los neutrófilos de ovino significativamente más sensibles al efecto tóxico de la leucotoxina que los de neutrófilos de bovino.<sup>43</sup>



Igualmente encontraron variaciones en los niveles de toxicidad, tuvieron cepas provenientes de animales enfermos con poca toxicidad y cepas provenientes de animales sanos con moderada toxicidad, así mismo encontraron variaciones en la actividad leucotóxica en neutrofilos de ovino y de bovino, y entre cepas del mismo serotipo.<sup>43</sup>

Los resultados de los diferentes estudios son difíciles de comparar debido a la variedad de métodos utilizados para la determinación de la actividad leucotóxica, las condiciones bajo las que se realizan los estudios y la diversidad en la presentación de los resultados.

## **7.1 CONCLUSIONES.**

-Se demostró la presencia de la leucotoxina en los sobrenadantes de 50 cepas de *Manheimia haemolytica* provenientes de aislamientos de exudado nasal de bovinos productores de leche, tanto de sanos como de enfermos de neumonía.

-La capacidad de producción de leucotoxina en los aislamientos provenientes de exudados nasales de bovinos enfermos de neumonía fue mayor que en los de bovinos sanos.

## REFERENCIAS.

1 Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005; 36:133-156.

2 Bowland SL, Shewen PE. Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada. Can Vet J 2000; 41:33-48.

3 Trigo TF. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelisis pulmonar bovina. Vet Mex 1991; XXII: 131-134.

4 Jaramillo AC, Suárez GF, Trigo TF. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. Vet Mex 2009; 40: 293-314.

5 Blanco VF, Trigo TF, Jaramillo ML, Aguilar RF, Tapia PG, Suárez GF. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet Mex 1993; 24:107-112.

6 Rice A, Carrasco ML, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 2007; 8:117-128.

7 Jaramillo ML, Zenteno E, Trigo TF. Mecanismos de patogenicidad y adherencia de *Pasteurella haemolytica*. Rev Lat Amer Microbiol 1999; 41:105-116.

8 Angen O, Muttters 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; 67-86.

9 Lo RYC. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 2001; 83:23-35.

10 Burrows LL, Olah- Winfield E, Lo RYC. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect Immun* 1993; 61: 5001-5007.

11 Al-Ghamdi MG, Ames RT, Baker CJ, Walker R, Chase CC, Frank HG, *et al.* Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12:576–578.

12 Purdy CW, Raleigh HR, Collins JK, Watts LJ, Straus CD. Serotyping and Enzyme Characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* Isolates Recovered from Pneumonic Lungs of Stressed Feeder Calves. *Curr Microbiol* 1997; 34:244-249.

13 Blanco VF, Trigo TF, Jaramillo ML, Aguilar RF. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados de lesiones neumónicas de bovinos y ovinos de México. *Rev Lat-Am Microbiol* 1995; 37:121-126.

14 Pijoan AP, Aguilar RF, Morales AF. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California. *Vet Mex* 1999; 30:149-155.

15 Jaramillo AC, Hernández CR, Suárez GF, Martínez MJ, Aguilar RF, Jaramillo ML, *et al.* Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the north- central of Mexico. J Anim Vet Adv 2007; 6:404-409.

16 Jaramillo AC, Hernández CR, Suárez GF, Martínez MJ, Aguilar RF, Jaramillo ML, *et al.* Characterization of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudate and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of México. Res Vet Sci 2008; 84:7-13.

17 Jaramillo AC, Hernández CR, Campuzano OV, Suárez GF, González DR, Trigo TF. Characterization of *Mannheimia* sp. and *P. multocida* strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in México. J Anim Vet Adv 2007; 6:1398-1404.

18 McClenahan D, Hellenbrand K, Atapattu D, Aulik N, Carlton D, Kapur A, Czuprynski C. Effects of lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells. Clin Vaccine Immunol 2008;15: 338- 347.

19 Ackermann MR, Brogden KA. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Microbes Infect 2000; 2: 1079-1088.

20 Pandher K, Murphy GL, Confer AW. Identification of immunogenic, surface-exposed outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Vet Microbiol* 1999; 65:215-226.

21 Lee CW, Shewen PE, Cladman WM, Conlon JA, Mellors A, Lo RY. Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves. *Can J Vet Res* 1994; 58: 93-98.

22 Straus DC, Jolley WL, Purdy CW. Characterization of neuroaminidases produced by various serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun* 1993; 61:4669-4674.

23 Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci* 2001;6: 1128-1150.

24 Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, Panciera R, Alvarez LE, Rinehart C. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect Immun* 2000; 68:3916-3922

25 Petras SF, Chidambaram M, Ilyes EF, Froshauer S, Weinstock GM, Reese CP. Antigenic and virulence properties of de *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. Infect Immun 1995; 63: 1033-1039

26 Morales AF. Evaluación de mecanismos de patogenicidad de aislamientos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A2 productoras de neumonías en ovinos (tesis de doctorado). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.

27 Deshpande MS, Ambagala TC, Ambagala AP, Kehrl ME, Srikumaran S. Bovine CD18 Is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia(Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis . Infect Immun 2002; 70:5058-5064.

28 Jeyaseelan S, Sreevatsan S, Maheswaran SK. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. Anim Health Res Rev 2002; 3:69-82.

29 Sun Y, Clinkenbeard KD, Clarke C, Cudd L, Highlander SK, Dabo SM. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation. Vet Microbiol 1999; 65:153-166

30 Whiteley LO, Maheswaran SK, Weiss DJ, 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.

31 Confer AW, Fulton RW, Clinkenbeard KD, Driskel BA. Duration of serum antibody responses following vaccination and revaccination of cattle with non-living commercial *Pasteurella haemolytica* vaccines. Vaccine 1998; 20:1962-1970.

32 Confer AW, Clinkenbeard KD, Gatewood DM, Driskel BA, Montelongo M. Serum antibody responses of cattle vaccinated with partially purified native *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Vaccine 1997; 15: 1423-1429.

33 Brown JF, Leite F, Czuprynski CJ. Binding of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin to bovine leukocytes. Infect immun 1997; 65: 3719-3724.

34 Chang YF, Young RY, Post D, Struck DK. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect Immun 1987;55: 2348-2354.

35 Clinkenbeard KD, Mosier DA, Confer AW. Transmembrane pore size and role of swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect Immun 1989; 57: 420-425.



36 Shewen PE, Wilkie BN. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. Infect Immun 1982; 35:91-94.

37 Gentry MJ Confer AW Craven RC. Effect of repeated in vitro transfer of *Pasteurella haemolytica* A1 on encapsulation, leukotoxin production and virulence. J Clin Microbiol 1987;25:142-145.

38 Gatewood DM, Fenwick BW, Chengappa MM. Growth-conditions dependent expression of *Pasteurella haemolytica* A1 outer membrane proteins, capsule and leukotoxin. Vet Microbiol 1994; 41: 221-233.

39 Shewen. PE, Wilkie BN. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. Am J Vet Res 1985; 46: 1212-1214.

40 Akan M, Öncel Taner, Sareyyüpoğlu B, Haziroğlu R, Tel YO, Cantekin Z. Vaccination studies of lambs against experimental *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* infection. Small Rum Res 2006; 65: 44-50.

41 Henricks PA, Binkhorst GJ, Drijver AA, Nijkamp FP. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B4 and 5- hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1992; 60: 3238-3243.

42 Atapattu DN, Aulik NA, McCaslin DR, Czuprynski CJ. Brief treatment increases cytotoxicity of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in an LFA-1 independent manner. *Microb Pathog* 2008; 46: 159-165.

43 Fedorova ND, Highlander SK. Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect Immun* 1997;65: 2593-2598.

44 Murphy GL, Whitworth LC, Clinkenbeard KD, Clinkenbeard P. Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 1995; 63: 3209-3212.

45 Sweeney SJ, Silflow RM, Foreyt WJ. Comparative leukotoxicities of *Pasteurella haemolytica* isolates from domestic sheep and free-ranging bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Infect Immun* 1994; 30: 523- 528.

46 Thumbikat P, Dileepan T, Kannan MS, Maheswaran SK. Mechanisms underlying *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced oncosis and apoptosis of bovine alveolar macrophages. *Microb Pathog* 2005; 38: 161-172.

47 Li J, Clinkenbeard KD. Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 1999; 67: 2920-2927.

48 Maheswaran SK, Weiss DJ, Kannan MS, Townsend EL, Reddy KR, Whiteley LO, *et al.* Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin on bovine neutrophils: degranulation and generation of oxygen-derived free radicals. *Vet Immunol Immunopathol* 1992; 33: 51-68.

49 Saadati M, Gibbs HA, Parton R, Coote JG. Characterisation of the leukotoxin produced by different strains of *Pasteurella haemolytica*. *J Med Microbiol* 1997; 46: 276-284.

50 Davies RL, Baillie S. Cytotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation of the leukotoxin structural gene *lktA*. *Vet Microbiol* 2003; 92:263-279.

51 Czuprynski, CJ, Noel EJ. Influence of *Pasteurella haemolytica* A1 crude leukotoxin on bovine neutrophil chemiluminescence. *Infect Immun* 1990; 58: 1485-1487.

52 Rensburg EV, Preez JC, Ellis CE. Quantification of *Mannheimia haemolytica* leucotoxin by indirect ELISA. *Onderst J Vet Res* 2006; 73:241-250.

53 Preez CJ, Rensburg EV, Killan GS. Kinetics of growth and leukotoxin production by *Mannheimia haemolytica* in continuous culture. J Ind Microbiol Biotechnol 2008; 35: 611-618.

54 Rensburg EV, Preez JC. Effect of pH, temperature and nutrient limitations on growth and leukotoxin production by *Mannheimia haemolytica* in batch and continuous culture. J Appl Microbiol 2007; 102:1273-1282.

55 Gentry MJ, Confer AW, Kreps JA. Simple visual assay for the determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. J Clin Microbiol 1985; 22: 968-972.

56 Jaramillo ML, Aguilar FR, Suárez GF, Trigo TF. Challenge exposure of sheep immunized with live vaccine and culture supernatant of *Mannheimia haemolytica* A1: effects of revaccination. Small Rum Res 2007; 70: 209-217.

57 Pulido MF, Jaramillo ML, Trigo TF, Aguilar RF. Efecto potencial de diferentes adyuvantes en la respuesta inmune inducida por la administración de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* A1 en conejos. Vet Mex 1991; 22: 407-413.

58 Vega MV, Maheswaran SK, Leninger JR, Ames TR. Adaptation of a colorimetric microtitration assay for quantifying *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin and antileukotoxin. Am J Vet Res 1987; 48: 1559-1564.

59 Craig FF, Dalgleish R, Sutherland AD, Parton R, Coote JG, Gibbs HA, *et al.* A colourimetric, microplate assay for the leucotoxin of *Pasteurella haemolytica*. Vet Microbiol 1990; 22: 309-317.

60 Czuprynski CJ, Noel EJ, Ortiz CO, Srikumaran S. Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect Immun 1991; 59: 3126-3133.

61 Majury AL, Shewen PE. The effect of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxic culture supernate on the in vitro proliferative response of bovine lymphocytes. Vet Immunol Immunopathol 1991; 29: 41-56.

62 Greer ON, Shewen PE. Automated colorimetric assay for the detection of *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. Vet Microbiol 1986; 12: 33-42.

63 Duff GC, Galyean ML. Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. J Anim Sci 2007; 85:823-840.

64 Morales AF, Jaramillo ML, Oropeza VZ, Tórtora PJ, Trigo TF, Espino RG. Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. Vet Mex 1993; 24:97-105.

65 Shewen PE, Wilkie BN. Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. Can J Vet Res; 52:30-36.

66 Conlon JA, Shewen PE, Lo RYC. Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. Infect immun 1991; 59:587-591.

67 Katsuda K, Kamiyama M, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Eguchi M. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. Vet J 2007: Article in press.12

68 Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald RJ, DeLeo FR, Cole LR, Hoff SJ, Musser JM. *In vitro* serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production and *agr* nucleotide sequence. J Bacteriol 2002; 184: 1430-1437.

69 Curtiss R. Bacterial infectious disease control by vaccine development. J Clin Invest 2002; 110: 1061-1066.

70 Mostowy S, Tsolaky AG, Small MP, Behr MA. The *in vitro* evolution of BCG vaccines. *Vaccine* 2003; 21: 4270-4274.

71 Matthews KR, Jayarao MB, Guidry AJ, Erbe EF, W.P. Wergin WP and Oliver SP. Encapsulation of *Streptococcus uberis*: Influence of storage and cultural conditions. *Vet Microbiol* 1994; 39:361-367.

72 Sun Y, Clinkenbeard KD. Serum-free culture of *Pasteurella haemolytica* optimized for leukotoxin production. *AJVR* 1998; 59:851-855.

73 Tatum FM, Briggs RE, Sreevatsan SS, Zehr ES, Ling Hsuan S, Whiteley LO, *et al.* Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence 1998; 24:37-46.

74 Davies RL, Whittam TS, Selander RK. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (*LktA*) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *J Bacteriol* 2001; 183:1394-1404.